

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

EHRWEIN André

PHARMACIEN

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

EX-PRÉPARATEUR DE TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

DIPLOMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

né le 24 Mars 1921, à THAON-LES-VOSGES

Effets de l'Association Synergique du Phénol et du Sulfamide

SUR LE

Métabolisme Carboné et Azoté de Escherichia Coli

Travail du Laboratoire de Chimie

Soutenue le 30 OCTOBRE 1950, devant la Commission d'Examen

Président.....	MM. KAYSER
Juges.....	MARCHAL
	Mlle BESSON

IMPRIMERIE TOLLARD

LAXOU-NANCY

1950



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555808_0005

T H E S E
PRESENTÉE
A LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY
POUR OBTENIR
le Titre de Docteur de l'Université de Nancy
Mention "Pharmacie"

par

André E H R W E I N

Pharmacien,
Lauréat de la Faculté de Pharmacie,
Ex-Préparateur de Travaux Pratiques de Chimie Biologique,
Diplômé d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique,

Né à Thaon-les-Vosges (Vosges) le 24 mars 1921.

Effets de l'Association synergique du phénol et du sulfamide
sur le métabolisme carboné et azoté de ESCHERICHIA COLI.

présentée et soutenue le

1950, devant la Commission d'Examen

Président : M. KAYSER

Juges : M. MARCHAL

Mlle BESSON.

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen :

M. G. RICHARD

Assesseur :

M. A. MEUNIER

Professeurs :

MM. DOURIS R.,	Toxicologie et analyse chimique
MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Mlle FRANCOIS M.-Th.,	Matière médicale
MM. KAYSER F.	Chimie
RICHARD G.	Pharmacie chimique
FRANQUET R.,	Botanique
MARCHAL J.G.,	Microbiologie.

CHARGES DE MAITRISE DE CONFERENCES :

MM. STEIMETZ E.,	Sciences naturelles
JACQUEMAIN	Sciences physiques

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES :

M. MEUNIER A.,	Hydrologie
Mlle FRANCOIS M.-Th.,	Hygiène
MM. KAYSER F.,	Pharmacodynamie
RICHARD G.,	Chimie organique
MARCHAL J.G.,	Zoologie
BERNANOSE	Physique
ROBLLOT, Agrégé à la Faculté de Droit,	Déontologie
STEIMETZ E.,	Cryptogamie, Minéralogie



CHEFS DE TRAVAUX :

Mme LASSEUR	Microbiologie, Parasitologie
MM. BLOCH, Docteur ès Sciences	Chimie
MANGENOT	Micrographie
Mlle BESSON, Docteur ès Sciences	Chimie, Biologie
MM. MIRJOLET	Pharmacie
BERNANOSE, Docteur ès Sciences	Physique

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE :

M. VERNIER

PROFESSEUR HONORAIRE :

M. CORDEBARD

SECRETARIAT :

N.

Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.

à la mémoire de ma mère,

à mon père,

à ma femme.

A mon Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Doyen F. KAYSER

A M. Le Professeur MARCHAL.

A Melle S. BESSON
Docteur ès-Sciences
Chef de Travaux

qui ont bien voulu juger ma Thèse,

témoignage de gratitude.

AVANT - PROFOS

Avant d'exposer le résultat de mes recherches, il m'est particulièrement agréable de consacrer à l'usage en remerciant publiquement ceux qui m'ont permis de soutenir aujourd'hui cette Thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier M. le Doyen F. KAYSER qui a inspiré et dirigé cette étude, malgré ses nombreuses occupations.

Je suis très reconnaissant à M. le Professeur MARCHAL d'avoir bien voulu s'intéresser à mon travail et accepter d'en être juge.

Que Melle BESSON veuille agréer l'expression écrite de ma vive reconnaissance. Elle a été mon guide toujours patient et dévoué m'aidant et m'encourageant de ses conseils.

J'exprime enfin ma profonde gratitude à tous mes anciens Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Nancy et à ceux de l'Ecole Préparatoire de Médecine et de Pharmacie de Grenoble.

La partie expérimentale de ce travail fut terminée en 1948, mais à mon grand regret je dus retarder la soutenance de ma Thèse jusqu'à ce jour.

Le plan suivi dans l'exposé de nos recherches est le suivant :

Dans une Première Partie nous avons rappelé les principales données concernant le mode d'action des sulfamides, des phénols et de leur association.

Dans une seconde Partie nous avons d'abord indiqué quelques éléments du métabolisme d'*Escherichia Coli* et décrit la technique que nous avons utilisée pour nos essais personnels.

Nous avons, ensuite, donné le détail de nos expériences.

L'utilisation de la source azotée nous a peu retenu.

L'utilisation de la source carbonée a été envisagée plus largement. Nous avons étudié la disparition du glucose dans le milieu de culture, suivi la variation d'Indice Chromique de ce milieu, et enfin recherché et dosé certains produits de dégradation.

P R E M I E R E P A R T I E

CHAPITRE I

RAPPEL DES PRINCIPALES DONNEES ET THEORIES CONCERNANT LE MODE D'ACTION DES SULFAMIDES

I - APERCU HISTORIQUE.-

Bien qu'on puisse faire dater la chimiothérapie du début du XVI^e Siècle, au moment où Jacobus CARPENSIS traita la syphilis par le mercure, bien qu'en soignant la malaria par le quinquina on fit de la chimiothérapie sans le savoir; on s'accorde généralement à placer le début de cette science au commencement du XX^e Siècle avec les travaux d'EHRlich. Et déjà à cette époque, on mesura la différence d'action des agents pharmacologiques in vitro et in vivo une drogue puissamment active in vitro pouvait être détournée par l'hôte avant d'atteindre les microorganismes pathogènes, ou, trop toxique, elle tuait l'hôte! Quelques colorants actifs in vitro manifestaient encore une certaine activité in vivo; l'éthylhydrocupréine (optochine) protégeait un peu la souris contre le pneumocoque, mais était peu efficace et, de plus, elle s'est montrée dangereuse lorsqu'on l'a employée chez l'homme.

En 1919, HEIDELBERG et JACOBS (51), voulant conjuguer les bons effets des colorants azoïques et ceux de l'optochine, eurent l'idée de diazoter le p.aminobenzènesulfonamide avec la déhydrocupréine. Il est regrettable que ce composé ait été à peu près inactif; s'il eut été actif, comme la plupart des composés de cette série, il est probable que la thérapeutique par les sulfamides aurait été découverte 15 ans plus tôt et d'innombrables vies humaines eussent été épargnées!

Dans l'usine allemande d'I.G. Farbenindustrie se firent de nombreuses synthèses de colorants azoïques et tous les colorants furent essayés in vivo; on chercha, systématiquement, à introduire dans la molécule de ces corps le radical sulfonyl - SO₂ NH₂, en rapport à la liaison azo, à cause des propriétés favorables que ce radical communiquait aux colorants employés dans la teinture de la laine; c'est, en effet, un témoin de l'affinité de ce groupement sulfonyl à l'égard des protéines. Un premier composé actif fut tenté en Novembre 1931 et le Prontosil, qui devait devenir si célèbre

fut breveté le 24 Décembre 1932 par MIETZSCH et KLAREK. Expérimenté en Allemagne, dans le secret, il fût soudainement révélé au monde le 15 Février 1935 par DOMAGK (31). L'analyse et la synthèse de ce produit furent réalisées par E. FOURNEAU et ses Collaborateurs à l'Institut Pasteur de PARIS, et le Prontosil fût immédiatement spécialisé et vendu en France sous le nom de Rubiazol. En même temps TREFOUEL, Mme TREFOUEL, NITTI et BOVET (117) font connaître que si le Rubiazol, actif in vivo est inactif in vitro, c'est qu'il subit dans l'organisme des transformations qui libèrent une molécule active plus simple; cette molécule, c'est le p. aminobenzène sulfamide; elle exerce in vivo la même activité que le Rubiazol, et elle est active in vitro.

Dès lors, la synthèse de nouveaux sulfamides se poursuit à un rythme extraordinairement rapide; en 1947, 5.000 sulfamides avaient été synthétisés et leur essai clinique a fait l'objet de fort nombreuses publications.

Il s'agit en effet, pour le chimiste et pour le pharmacologue, de trouver des sulfamides polyvalents ou spécifiques, capables de détruire tous les germes pathogènes connus sans manifester d'action nocive pour l'homme; les sulfamides devraient, en outre, présenter des caractères de solubilité tels qu'ils puissent être employés, suivant les cas, par la voie digestive ou par des voies parentérales. Il s'agit, en effet, pour le clinicien de préciser les agents et les modalités de traitements les meilleurs pour guérir chaque type d'infection. Cette double tâche, si importante, explique l'extraordinaire floraison de travaux publiés, depuis 15 ans, sur les sulfamides.

2 - ACTION BACTERIOSTATIQUE ET ACTION BACTERICIDE DES SULFAMIDES.-

Les sulfamides actuellement connus ne sont actifs que sur certains microorganismes et, dans les conditions habituelles de leur essai, ou de leur emploi clinique, ils sont bactériostatiques et non bactéricides. Cela veut dire que les bactéries ne sont généralement pas tuées par l'emploi des sulfamides, à concentration thérapeutique mais in vitro leur multiplication est simplement ralentie ou stoppée. Si l'on transporte des bactéries ayant subi l'action des sulfamides dans un milieu de culture qui en soit exempt, on voit qu'au bout de 2 ou 3 heures le développement bactérien reprend et ne diffère apparemment pas de celui présenté par des bactéries de même espèce, mais qui n'auraient pas subi préalablement l'action des sulfamides.

Il semble, que, dans certains cas tout au moins, il soit facile de transformer l'effet bactériostatique en effet bactéricide. Si par exemple, on porte la température du milieu de culture, additionné de sulfamides, etensemencé de bactéries, de 37 à 40°, on provoque la mort des bactéries (91) (123) (58).

Cette action favorable de la température sur l'action des sulfamides expliquerait sans doute certaines extraordinaires deffervescences thermiques provoquées par les sulfamides; il semblerait, en effet, que, également in vivo, les agents pathogènes soient d'autant plus sensibles aux sulfamides que la température du milieu interne est plus élevée.

Cependant, ces cas de pouvoir bactéricide sont inhabituels en clinique et en expérimentation, la bactériostase est le cas habituel. A quoi correspond-elle exactement ? En quoi une bactérie en état de stase se distingue-t-elle d'une bactérie normale ? On peut penser que la bactériostase correspond à un état de vie ralentie, comme on en trouve des exemples avec les spores des champignons ou avec les graines des phanérogames; on avait même drù, dans les premières recherches faites sur ce sujet, que les microorganismes sensibles à l'action des sulfamides s'entouraient d'une capsule protectrice.

En faveur de l'hypothèse d'une vie ralentie des germes soumis à l'action des sulfamides, on a invoqué la diminution de leur consommation d'oxygène, mesurée à l'aide d'un appareil de Warburg, et traduisant une atteinte de la respiration. Cependant cette diminution de la respiration, constatée par rapport à une culture témoin, pourrait être due à ce que le nombre des cellules n'a pas augmenté dans le milieu sulfamidé (6) (6I).

On peut aussi penser qu'une bactérie à l'état de stase ne diffère d'une bactérie normale que parce qu'elle a perdu le pouvoir de se diviser. On a pu mettre en évidence des modifications morphologiques des bactéries soumises à l'influence des antibiotiques: augmentation de volume, passage à une forme filamenteuses correspondant à une élongation sans scission. La plupart des travaux concerne l'action de la pénicilline ou de la streptomycine, mais ainsi que le rappelaient récemment J.G. MARCHAL, A. DUPAIX-LASSEUR et P. ANDRE (79), les effets des sulfamides sont, d'après les quelques publications qui leur sont consacrées, tout à fait analogues; et nous-mêmes, nous avons pu, au Laboratoire, noter que les sulfamides faisaient parfois apparaître, chez le Colibacille, des formes d'aspect très différent du type normal.

Encore faut-il connaître les troubles métaboliques responsables de ces modifications morphologiques. Les différences d'affinité tinctoriale donnent déjà une indication (73). Mais la cytochimie seule permettra de résoudre le problème; les beaux travaux de BOIVIN et de ses collaborateurs ont ouvert la voie (I2) (I3).

Rappelons que l'action bactériostatique ne se fait pas sentir immédiatement après le contact des sulfamides; les bactéries, même les plus sensibles, continuent à se multiplier un certain nombre de fois à un rythme normal, avant que la division cesse de se produire (39).

3 - MODE D'ACTION DES SULFAMIDES.-

On a cherché à expliquer ce pouvoir bactériostatique des sulfamides, et on a proposé plusieurs interprétations dont R.J. HENRY donnait une vue d'ensemble en 1944 (52) et que NORTHEY (93) a complétée en 1948.

a) L'action des sulfamides est due à ce qu'ils subissent des transformations chimiques.

L'existence de cette phase de latence (qui sépare le moment où le germe est en contact avec le sulfamide de celui où son pouvoir de division est provisoirement inhibé) a d'abord suggéré que ce n'est pas le sulfamide lui-même qui est actif sur la cellule bactérienne, mais un produit auquel il aurait donné naissance sous l'influence des enzymes contenus dans cette cellule. On était d'autant plus facilement conduit à faire cette hypothèse, que l'on gardait en mémoire la merveilleuse conception de E. FOURNEAU qui avait conduit à substituer au Prontosil, le sulfanilamide à molécule beaucoup plus simple.

On a ainsi pensé que le sulfamide pouvait s'oxyder sous l'influence de la bactérie et faire naître des composés où la fonction hydroxylamine $-NHOH$, ou la fonction nitroso $-NO$, auraient remplacé la fonction amine $-NH_2$. Ces dérivés hydroxylaminés ou nitrosés ont été préparés et ils sont effectivement plus actifs que le sulfamide originel, et agissent sans qu'il y ait phase de latence (84) (17). Mais leur toxicité et leur instabilité rendent difficile l'appréciation de leur activité in vivo. Si de tels corps $-hydroxylaminés$ ou $nitrosés$ - étaient fournis par les germes sensibles, ils le seraient à l'intérieur même des bactéries, car leur existence dans le milieu de culture n'a pu être décelée ni par des procédés chimiques, ni par le procédé biologique, pourtant sensible, dont voici le principe : le milieu de culture, contenant des sulfamides et où se sont trouvés des germes qui y sont sensibles, est privé de germes par centrifugation et réensemencé avec de nouveaux germes; si les premiers germes avaient fait naître dans le milieu un composé chimique capable d'agir immédiatement sans phase de latence, les nouveaux germes devraient être immédiatement en état de bactériostase; or ce n'est pas le cas et la phase de latence habituelle se produit également pour eux.

Pourtant des malades traités par les sulfamides présentent dans leur sang (37) et dans leurs urines (56) des produits hydroxylaminés. Mais, réciproquement, si on injecte à des chiens, par voie intraveineuse, de tels produits, ils sont si rapidement réduits dans l'organisme de l'animal qu'il semble impossible qu'ils aient eu le temps d'atteindre les bactéries sensibles. Toutes ces données sont

compatibles avec la possibilité suivante : l'oxydation du sulfamide en un composé plus actif se ferait à la surface ou à l'intérieur même de la cellule bactérienne et agirait immédiatement (14) (83). Il est difficile de confirmer ou d'infirmer une telle hypothèse. On aurait pu penser que si l'oxydation du sulfamide doit intervenir pour lui permettre de manifester son activité, des résultats moins favorables pourraient être obtenus dans des conditions d'anaérobiose qu'en aérobiose. Les résultats expérimentaux ont été assez contradictoires (58) (15) (38) et dépendent sans doute de l'existence, dans le milieu de culture, d'accepteurs d'hydrogène.

Dans des expériences faites sur E. COLI, l'action du sulfamide n'est pas influencée par l'apport d'oxygène (85).

Les travaux plus récents de WILLIAMS (124) s'opposent à l'explication de l'activité bactériostatique des sulfamides par formation d'un composé d'oxydation actif. L'auteur a isolé de l'urine de malades traités au sulfanilamide un produit d'oxydation, la 3-hydroxysulfanilamide, dont il a essayé l'action in vivo et in vitro sur le streptococque hémolytique : in vivo, il n'y a aucune action, et in vitro l'action est plus faible que celle du sulfanilamide lui-même.

b) L'action des sulfamides est due à ce qu'ils inhibent certains biocatalyseurs.

L'éventuelle oxydation des sulfamides par les bactéries devait conduire à étudier l'action de ces composés sur les diverses diastases catalysant les oxydations cellulaires; ces travaux rejoignent ceux entrepris avec d'autres conceptions et qui, systématiquement, cherchaient à mettre en évidence des actions inhibitrices présentées par les sulfamides sur ces enzymes et dont nous allons rapidement résumer les résultats.

Déshydrogénases

Dans certains cas, la respiration est inhibée en présence de sulfamides. Pour FOURNEAU et ses collaborateurs (36) et pour SEVAG (104), cette inhibition coïncide avec l'arrêt de multiplication, mais il ne s'agit très probablement que d'une relation indirecte(2).

KOHN et HARRIS (64) n'ont pas décelé d'influence des sulfamides sur la consommation d'oxygène de suspensions d'ESCHERICHIA COLI.

D'ailleurs de nombreux essais effectués dans l'appareil de Warburg comportent une cause d'erreur, l'intervention possible de gaz autres que le gaz carbonique ou l'oxygène. On sait qu'E. COLI par exemple est susceptible de produire de l'hydrogène (94).

ALTMAN (2) a cherché l'effet des sulfamides sur chacun des composants du système enzymatique respiratoire impliqué dans l'oxydation du glucose - 6 - phosphate, et a obtenu les résultats suivants : l'activité du ferment intermédiaire de Warburg est fortement inhibée par les sulfamides, tandis que le cytochrome c, la coréductase du cytochrome, la déshydrogénase lactique sont beaucoup moins touchés; le coenzyme II et la cytochrome oxydase ne le sont pas du tout.

Lorsque le sulfamide agit comme inhibiteur d'un enzyme, on a pu considérer qu'il entrerait en compétition avec le coferment vis à vis de l'apoferment; cette manière de voir est justifiée par le fait que l'addition d'excès de coferment protège l'apoferment contre le sulfamide.

L'inhibition due au sulfamide peut être prévenue par addition de glucose-6-phosphate. De leur côté, ANDERSON, PILGRIM, ELVERJEM (3) avaient déjà montré que malgré l'antagonisme sulfamide-amide nicotinique, le sulfamide n'inhibe pas l'action du coenzyme I de la levure ou des tissus.

L'effet des sulfamides sur la respiration a été interprété d'une autre manière par WOODS (130). Les sulfamides empêchent la synthèse de l'adénine par les bactéries, or l'adénine fait partie des coenzymes I et II indispensables dans le transport d'hydrogène qui assure le métabolisme cellulaire.

En définitive, l'inhibition des déshydrogénases par les sulfamides semblent avoir été reconnue par la majorité des auteurs, mais la sensibilité de ces enzymes aux sulfamides est très diverse. (40).

Catalase.-

Comme cet enzyme décompose l'eau oxygénée, empêchant ainsi son accumulation, c'est à une inhibition de la catalase par les sulfamides qu'on a rapporté les concentrations plus élevées en eau oxygénée trouvées dans les cultures contenant des sulfamides (86). Mais ceci n'explique pas la sensibilité aux sulfamides, in vitro, de microorganismes qui ne produisent pas d'eau oxygénée (77) (44).

En fait, si certains sulfamides ont une action inhibitrice sur la catalase (SCHULER, MEIER, 1944), cette inhibition ne serait pas liée au pouvoir bactériostatique (96). D'ailleurs, pour certains auteurs (78), l'activité de la catalase ne serait pas modifiée.

In vivo, on a remarqué que l'action bactériostatique des sulfamides sur *Streptococcus* est augmentée par addition de sang - source de catalase (127) (57).

D'autre part, les sulfamides font baisser le taux de catalase du sang. L'augmentation de la sulfamidémie s'accompagne d'une variation de la catalasémie qui lui est inversement proportionnelle (20).

Nous avons dit que chez les sujets traités aux sulfamides, l'urine contient des corps à groupements hydroxylamine et nitrosé. Il y a donc oxydation des sulfamides; aussi ROSENTHAL et BAUER (100) ont suggéré que l'effet des sulfamides pourrait être attribué à l'action de ces corps sur la catalase.

En définitive, on ne peut imputer l'action bactériostatique des sulfamides à leur action sur la catalase.

Anhydrase carbonique.-

Le sulfanilamide est inhibiteur de l'anhydrase carbonique à des concentrations très faibles (supérieures cependant à $2 \cdot 10^{-6}$ M. (78).

L'affinité de cet enzyme pour le sulfanilamide paraît être au moins un millier de fois plus grande que celle qu'il présente vis à vis du gaz carbonique. (62) (9).

Alors que l'acétylation du groupement NH_2 fixé sur le noyau n'affecte pas l'action inhibitrice du sulfamide sur l'anhydrase carbonique, la substitution de l'H du groupement SO_2NH_2 (comme dans la sulfapyridine et le sulfathiazole) abaisse au contraire, ou même annule cette activité. (10)

On a cru trouver une preuve de l'action directe des sulfamides sur l'anhydrase carbonique dans le fait que l'administration de sulfanilamide à des poules diminue l'épaisseur de la coquille des oeufs; cependant l'administration de sulfapyridine (qui n'agit pas sur l'anhydrase carbonique) produit le même effet. (46)

On ne peut donc attribuer l'action bactériostatique des sulfamides en général à l'inhibition de l'anhydrase carbonique (27).

Carboxylase.-

SEVAG et ses collaborateurs (105) ont montré que des sulfamides inhibent la carboxylase de la levure et des bactéries, tandis que MANN et KEILIN (78) n'avaient trouvé aucune action du sulfamide sur cet enzyme.

Il en résulte que la bactériostase sulfamidique ne peut être imputée de façon générale à l'action de ces corps sur la carboxylase.

Divers enzymes.-

Certains enzymes ne semblent avoir aucun rapport avec l'action bactériostatique des sulfamides.

Pour ABDERHALDEN (I) les sulfamides n'agissent ni sur la pepsine, ni sur la trypsine, ni sur les peptidases à l'état de systèmes enzymatiques isolés. L'uréease ni la peroxydase ne seraient touchées par les sulfamides (78) (75).

L'interférence des sulfamides avec des biocatalyseurs tels que l'acide ascorbique, la biotine, l'acide folique, la vitamine K, a été étudiée en général chez l'animal et les observations faites au cours de ces expériences n'ont pas toujours de rapport direct avec le pouvoir bactériostatique des sulfamides; or, d'est là le seul point de vue qui nous intéresse ici.

c) L'action des sulfamides est due à ce qu'ils entrent en compétition avec l'acide para-aminobenzoïque.

Les théories de WOODS (129) et de FILDES (34) qui interprètent l'action bactériostatique des sulfamides par une compétition avec l'acide para-aminobenzoïque (P.A.B.) pour un système enzymatique indispensable à la croissance des germes sulfamido-sensibles, offrent au contraire une explication extrêmement attrayante du mode d'action des sulfamides. P.A.B. est considéré comme un métabolite essentiel, synthétisé par certaines bactéries et exigé dans un ou plusieurs systèmes enzymatiques nécessaires au métabolisme normal de la cellule.

La technique dite "inhibition analysis" de SHIVE (106) est basée sur le principe suivant : si un inhibiteur du métabolisme inhibe une réaction A et bloque de ce fait la croissance d'une bactérie, l'addition du produit qui serait formé en A doit permettre le rétablissement de la croissance. Pour une plus forte concentration de l'antagoniste, une deuxième réaction peut être inhibée et l'addition du produit de cette deuxième réaction réduit encore la sensibilité de l'organisme à l'inhibiteur. Mais d'autres corps que ceux produits dans la réaction A (ou dans la deuxième réaction) peuvent aussi lever l'inhibition apportée par l'inhibiteur.

Le postulat de base dans l'étude des antagonismes compétitifs est qu'en raison de similitudes de structure, les antagonistes se combinent réversiblement, à un enzyme (ou système enzymatique) au même point que le ferait le métabolite essentiel avec lequel il est en compétition.

De très nombreuses recherches ont établi que la bactériostase provoquée par les sulfamides est due au remplacement compétitif de P.A.B. WOODS(I28) montre, par exemple, que, pour six sulfamides essayés, l'inhibition par P.A.B. est proportionnelle à l'activité bactériostatique de chacun. Tandis que SPINK et ses collaborateurs (II2) prouvaient que le développement de souches de Staphylocoques sulfamido résistants produisent plus de P.A.B. que les souches sensibles. Mais il y a des expériences contradictoires et cette compétition entre sulfamides et P.A.B. a dû être précisée.

On a réussi, il est vrai, à faire cadrer la plupart des faits connus dans cette théorie, si bien que la conception de WOODS reprise et élargie par FILDERS, est à la base de toutes les théories modernes du mode d'action des sulfamides (93).

On a trouvé que des acides aminés et des bases puriques (arginine, lysine..., guanine, xanthine) s'opposent, dans certaines conditions, à l'activité des sulfamides. Or, chez E. COLI tout au moins, P.A.B. intervient dans la synthèse des purines.

Quant au mode d'intervention de ces substances, nous avons indiqué plus haut que l'effet des sulfamides sur la respiration pourrait provenir de ce que l'adénine fait partie des enzymes respiratoires (WOODS, I947).

On a signalé aussi l'action antisulfamide in vitro de la méthionine (IO6) (I25). KOHN et HARRIS (64) ont expliqué ce pouvoir de la méthionine en supposant qu'il y a parmi les réactions nécessaires à la multiplication un groupe particulier de réactions dans lequel entre la méthionine; et la synthèse de cette dernière est catalysée par P.A.B.

WINKLER et de HAAN (I25) ont pu rapporter l'action bactériostatique du sulfanilamide chez E. COLI à l'inhibition de quatre systèmes enzymatiques concernant la méthionine, la xanthine, la sérine, l'acide ptéroylglutamique.

Ces diverses actions enzymatiques (qui sont en rapport avec P.A.B.) ont pu être inhibées successivement avec le sulfamide : la réaction la plus sensible à l'antibiotique est celle qui produit la méthionine, puis les réactions qui produisent la xanthine et les autres purines. La synthèse de la sérine et celle de l'acide ptéroylglutamique sont inhibées par les sulfamides, mais seulement à plus forte concentration. Le sulfamide bloque l'incorporation de P.A.B. dans l'acide ptéroylglutamique probablement au stade de combinaison de P.A.B. (ou du glutamate de P.A.B.) avec la pteridinaldéhyde (II8) P.A.B. intervient très certainement dans la synthèse de la guanine, de la xanthine et autres base puriques, mais intervient aussi dans le métabolisme de l'asparagine, de la cystine, du tryptophane par divers microorganismes (Salmonella Paratyphi) (I9).

L'acide folique inhibe, de façon non compétitive, la bactériostase provoquée par les sulfamides sur certains germes (E. COLI) et cela à des doses où il provoque la croissance d'organismes pour lesquels il est indispensable (69). On en a conclu que c'est la synthèse de l'acide folique à partir de P.A.B. qui est inhibée par le sulfamide chez E. COLI (69) (II8).

On a dit aussi (50) (II5) que les sulfamides inhibent les réactions de synthèse des protéines. Sans doute de telles réactions mettent en jeu acides nucléiques et méthionine. On a montré (IO8) que l'acide folique pouvait jouer un rôle dans la synthèse des acides nucléiques, et également protéines.

Quant à l'influence de corps complexes (peptines - protéines) sur l'action bactériostatique des sulfamides, elle pourrait être rapportée à des composants actifs (antisulfamides) mais aussi - et ceci n'est pas en rapport avec l'activité antibiotique - à une modification de la nutrition du microorganisme placé dans de tels milieux (voir DELACROIX (23) Comment ne pas signaler l'importance du glucose ? Un Staphylocoque résistant aux sulfamides est effectivement inhibé dans un milieu sans glucose, mais ne l'est pas en milieu glucosé; quant le glucose est remplacé par le pyruvate la croissance est fortement ralentie, or la quantité de P.A.B. formée dans ces conditions est plus grande qu'en présence de glucose.

Donc si des divergences apparaissent au cours des recherches entreprises pour élucider le mode d'action des sulfamides sur le métabolisme, au fond il n'y a souvent pas contradiction, car les résultats dépendent beaucoup des conditions réalisées (nature du milieu, du germe, du sulfamide).

d) L'Action des sulfamides est due à leur ionisation (39) (IO7) (25)

Cette théorie d'action est basée sur les hypothèses suivantes :

La forme moléculaire du sulfamide pénètre seule dans la cellule, mais, à l'intérieur de la cellule, c'est seulement la forme ionisée qui est active. L'activité d'un sulfamide serait donc conditionnée par son pourcentage d'ionisation.

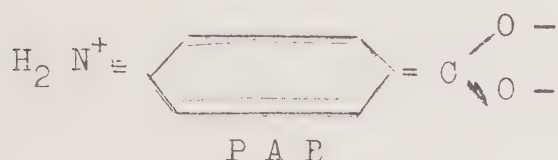
Cette hypothèse postule implicitement que les ions des différents sulfamides sont également actifs et attribue au pH intracellulaire une valeur arbitraire de 6 (le pH intracellulaire, en effet, n'a jamais pu être mesuré de façon irréprochable).

En conséquence, les sulfamides les plus actifs seraient ceux qui sont ionisés à 50 p. 100 dans le milieu de culture, c'est-à-dire pour lesquels $pK_a = 7$ ($pK_a = \log_{10} \text{ de l'inverse de la constante de dissociation acide du sulfamide}$). Mais il existe des sulfamides qui ne s'ionisent pas au pH de l'expérience et qui sont pourtant actifs, donc la forme moléculaire du sulfamide peut être parfois active. Par ailleurs des isomères ayant des pK_a identiques ont des activités in vivo différentes.

e) L'action des sulfamides est due à une résonnance de ces corps et de P.A.B.

Contrairement à la théorie précédente, la théorie de la résonnance de KUMLER (65 à 67) explique la compétition manifeste qui existe entre sulfamides et P.A.B.

Des essais sur la mobilité dans des champs électriques de E. COLI en présence de sulfamide ou en présence de P.A.B. donnent des résultats semblables, c'est-à-dire que ces substances se comportent de façon analogue à la surface des germes. On a donc pensé que l'activité bactériostatique est due à la polarité par résonnance de ces corps : P.A.B. et sulfanilamide ont des formes résonnantes semblables avec une séparation de charge



Si les isomères méta sont inactifs c'est parce qu'ils ne peuvent présenter cette résonnance. Quant aux isomères ortho inactifs il faut penser que l'absence d'activité est provoquée par l'existence d'une liaison Hydrogène ou par la nature de la configuration spatiale de ces corps.

CHAPITRE II.

RAPPEL DES PRINCIPALES DONNEES CONCERNANT L'ACTION DES PHENOLS ET DE L'ASSOCIATION DES SULFAMIDES AVEC LES PHENOLS

On sait depuis longtemps que E. COLI est capable de se développer en présence d'acide phénique (à faible concentration, naturellement) et on a mis à profit cette propriété pour la recherche d'E. COLI dans les eaux (méthode dite de Vincent).

On ne connaît pourtant pas encore les relations exactes qui existent entre le phénol et E. COLI : le germe, d'une part, est relativement phénico-résistant et, d'autre part, il serait capable de synthétiser le phénol (IIO).

Si on cultive E. COLI sur bouillon en présence de phénol, il perd la propriété de fournir de l'indol en eau peptonée; son pouvoir de fermentation du sucre serait modifié pour les uns (33) ou ne serait pas touché pour d'autres (76).

E. COLI semble donc se comporter vis à vis du phénol d'une manière un peu particulière, mais on peut cependant mettre en évidence une action bactéricide du phénol aussi nette vis à vis d'E. COLI que vis à vis des autres germes. Cette action du phénol sur les microorganismes a été particulièrement étudiée puisqu'elle sert souvent de référence; l'action d'un antiseptique à étudier est comparée à celle d'un même poids de phénol agissant dans les mêmes conditions (coefficient phénol). (29).

On a même pu distinguer dans le pouvoir antiseptique, une action antigénétique (dose antigénétique = quantité de substance qu'il suffit d'ajouter à un litre de bouillon de culture pour y empêcher le développement d'une quantité connue de germes dans des conditions favorables déterminées) et une action antibactérienne (dose antibiotique = quantité de substance qu'il suffit d'ajouter à un litre d'un milieu déterminé pour tuer en un temps donné une quantité connue de germes). On a aussi employé les termes : bactériostatique et bactéricide.

Quelles que soient les appellations différentes attribuées à ces deux modes d'action, ils représentent, en fait, des degrés dans le pouvoir antiseptique. Ils ont été mesurés par des méthodes variées (68).

Les résultats obtenus par les différents auteurs en ce qui concerne les effets bactériostatique et bactéricide sont assez discordants, les conditions réalisées n'étant pas les mêmes (souvent le coefficient est déterminé à 20° au lieu de 37°). L'accord ne s'est pas encore fait sur les coefficients phénol à attribuer aux principaux antiseptiques connus, même pour des composés ayant une proche parenté chimique. Le classement des phénols, par exemple par ordre d'activité antiseptique, varie suivant les auteurs (II4). De plus le mécanisme de l'action bactéricide doit être considéré comme différent pour chaque microorganisme.

CORDA (24) a comparé le pouvoir bactéricide du phénol et des trois diphénols (pyrocatechine, résorcine, hydroquinone) sur E. COLI et sur Staphylococcus : le phénol est le bactéricide le plus puissant, l'activité décroît de la pyrocatechine à la résorcine puis à l'hydroquinone. Pour un même germe, la sensibilité aux phénols varie suivant l'âge des cellules. Plus les cellules microbiennes sont jeunes, plus elles sont sensibles au phénol (IQ9)

De nombreux travaux ont été consacrés à la recherche du mode d'action des phénols. Par opposition aux germicides chimiques (ex : colorants) on avait classé les phénols parmi les germicides physicochimiques en raison de leur action dénaturante sur les protéides et les lipides (22) (23).

S'agit-il d'une action sur la membrane cellulaire, suivant l'interprétation de l'action médicamenteuse de HURST (54) ? Le phénol, comme les autres corps phénoliques, est d'ailleurs caractérisé par une grande liposolubilité, ce qui expliquerait une pénétration rapide dans la cellule microbienne. On a montré, dans cet ordre d'idées, que les solvants organiques, augmentent l'action bactéricide des phénols (2I).

SUTER (II4) suggérerait de chercher à relier l'action des phénols à d'autres propriétés que leur structure chimique, par exemple à leur coefficient de partage entre solvants, à l'absorption ou à la tension interfaciale. De fait, ORDAL et SACKS (95) ont montré que des produits anioniques fortement tensioactifs augmentaient l'action germicide du phénol, tandis que BECK (8) a pu rapporter les différences d'action entre désinfectants chimiques analogues à des différences d'absorption.

Par ailleurs la présence de corps à fonction basique qui augmentent la solubilité des phénols dans l'eau ne semble pas modifier leurs propriétés bactéricides (98).

Mais il est bien probable que l'action germicide des phénols est en partie conditionnée par leur plus ou moins facile oxydation en quinhydrone, quinones, etc... Il s'établit sûrement dans

le milieu de culture un équilibre dynamique entre les phénols et leurs produits d'oxydation dont le pouvoir antiseptique est donc également à prendre en considération.

NEUMANN (92) n'a-t-il pas suggéré que la toxicité de la pyrocatechine était due pour la plus grande part à la p-quinone. On connaît bien l'action antibiotique des quinones (HOFFMANN-OSTENHOF.)

On l'a attribuée à une inhibition de certains enzymes dans le cas de faibles concentrations, et à une propriété "tannante" donc dénaturante dans le cas de concentrations élevées (53). On a mis en évidence une relation certaine entre le potentiel d'oxydo-réduction et l'action bactériostatique des quinones (80). Et, si on range les quinones suivant leur ordre d'activité croissante vis à vis des germes gram-, on trouve que cet ordre coïncide avec la stabilité de la semiquinone correspondante (45).

L'association des sulfamides et des phénols a déjà été étudiée. Elle paraissait devoir être intéressante, puisqu'elle permettait d'associer deux substances s'opposant au développement bactérien par des mécanismes certainement dissemblables

Tandis que MARMORI (82) ne trouve ni influence du phénol sur l'action du sulfamide, ni influence de P.A.B. sur le pouvoir bactéricide du phénol vis à vis des microorganismes, NEUMANN (92) obtient des résultats assez surprenants :

La croissance d'*Aspergillus niger* est inhibée par la pyrocatechine et par la p.quinone. L'inhibition provoquée par la p.quinone peut être levée partiellement par le sulfanilamide et par P.A.B.. L'inhibition due à une certaine quantité de pyrocatechine est également levée partiellement par P.A.B. employé à doses convenables; avec le sulfamide on obtient des récoltes supérieures à celles du témoin. Inversement, l'inhibition de croissance d'*Aspergillus niger* provoquée par le sulfanilamide peut être levée par le phénol et par certains diphénols.

Les activités antisulfamide des phénols étudiés se rangent dans l'ordre suivant (la concentration antisulfamide de P.A.B. étant prise comme unité) : Hydroquinone 310 - Phénol 833 - Pyrocatechine 1666 - Résorcine 7500. Dans son étude sur l'association du sulfanilamide et des phénols, J. POUCHOL (97) a également obtenu des résultats assez curieux. *E. COLI* est cultivé en milieu synthétique en présence de l'association du sulfamide et de chacun des phénols suivants : phénol, pyrocatechine, résorcine, hydroquinone,

phloroglucine. Suivant les concentrations employées, le résultat de telles associations a été soit une simple addition des deux actions antibiotiques, soit une véritable potentialisation de l'effet du sulfamide, soit une levée d'inhibition due à l'un des agents par l'autre agent qui lui était associé. Nous citerons, comme exemple, les associations de sulfanilamide et de phénol suivantes :

Sulfanilamide 0,01 p. 100 et phénol 0,1 p. 100 : il y a simple addition des deux actions antibiotiques.)

Sulfanilamide 0,01 p. 100 et phénol 0,05 p. 100 : il y a renforcement de l'action inhibitrice.

Sulfanilamide 0,005 p. 100 et phénol 0,1 p. 100 : il y a levée partielle de l'inhibition, due au phénol.

S E C O N D E P A R T I E

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I

LE DEVELOPPEMENT D'ESCHERICHIA COLI

ETUDE DU METABOLISME DE CETTE BACTERIE DANS DIVERSES CONDITIONS.

Nous avons donné comme but à nos travaux personnels l'étude de certains aspects du métabolisme de E. COLI en milieu synthétique glucosé, additionné ou non de sulfamide, de phénol ou de ces deux agents à la fois; nous avons choisi de préférence dans nos expériences, les associations de sulfamide et de phénol présentant une synergie des actions qu'auraient manifestées ces substances utilisées isolément.

Avant d'aborder l'étude même de ce problème, il nous faut rappeler succinctement quels sont les besoins nutritifs d' E. COLI, sa composition chimique et son métabolisme.

I) Données bibliographiques.

Besoins nutritifs de E. COLI

E. COLI n'a pas besoin de facteurs de croissance pour se développer dans les milieux synthétiques. Le milieu de Peré (1892) qui contient uniquement des sels minéraux et un sel ammoniacal comme source de C. et d'N lui convient bien. Il existe d'ailleurs de très nombreuses formules de milieux synthétiques dont se accomode le colibacille.

Une notable augmentation de croissance est obtenue par addition de Mg et de Fe au milieu.

Composition chimique de E. COLI

La composition globale d'E. COLI serait pour 100 g. de poids sec : (5)

Protides	65,4 g.
Lipides	15
Glucides	10
Cendres	9,6

La composition des cendres a été également déterminée (GUILLEMIN et LARSON, d'après TAUGWALDER) (116).

Ca ₃ (PO ₄) ₂	35,61	K	12,95	p. 100 g. de cendres
MgO	5,92	Na	2,61	
S O ₄	1,78	P ₂ O ₅	33,99	
Fe ₂ O ₃	3,35			

Données sur le métabolisme de E. COLI.

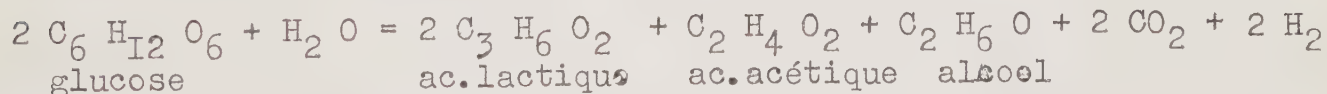
a)- Utilisation de la source azotée

Les sources azotées les plus diverses peuvent être utilisées par E. COLI mais elles influent sur le métabolisme, même sur le métabolisme carboné, comme l'ont montré TULASNE et WURTZ (120)

SARTORY, MEYER et BURY (102) étudient l'intensité du métabolisme azoté des colibacilles, en dosant l'azote de la récolte bactérienne; ils voient là une possibilité indirecte de mesure du développement bactérien.

b)- Utilisation du glucose en tant que source carbonée

HARDEN (49) paraît avoir été le premier à étudier l'action d'E. COLI sur le glucose. Les cultures étaient faites en eau peptonée additionnée de glucose et placées en atmosphère d'azote. Il se forme de l'acide lactique en quantité n'excédant pas 50 p. 100 du poids de glucose fermenté, de l'alcool et de l'acide acétique en quantités à peu près égales correspondant chacune à 1/6 environ du poids du glucose, et du gaz carbonique de 1/6 à 1/12 du poids du glucose mis en oeuvre. La formule générale suivante traduirait la réaction essentielle :



GREY (47) utilisait des suspensions d'E. COLI dans de l'eau chargée de sels, mais sans addition de substance azotée et suivait la décomposition du glucose grâce à des dosages effectués 6, 12, 23, 31 et 37 heures après le début de l'expérience.

Il y a d'abord production d'alcool, d'acide formique, d'acide succinique; le poids de sucre fermenté correspond aux produits formés durant cette période, et qui se retrouvent intégralement dans le milieu de culture.

Puis les produits de dégradation ne subsistent plus en quantités équivalentes à celle du sucre disparu pendant cette période; une partie des produits du catabolisme glucidique est utilisée à la synthèse de la matière vivante.

Ensuite il y a décomposition d'une certaine quantité de substances formées pendant la première phase, et enfin il y a apparition d'acide lactique.

AUBEL et SALABARTAN (5), rappelant ces études, pensent que l'acide pyruvique est source de matière vivante et d'énergie, et que l'acide lactique, au contraire, ne serait pas directement utilisé.

RONA et NICOLAI ayant obtenu des résultats en désaccord avec ceux de HARDEN, GREY (qui au contraire ont été à plusieurs reprises confirmés par d'autres auteurs (voir II3), STOCKES (1949) (II3) a étudié à nouveau la fermentation du glucose par E. COLI en associant les mesures manométriques et les dosages chimiques. Le schéma de HARDEN peut être considéré comme exact, dans les conditions expérimentales choisies; mais il y a lieu d'envisager également la formation de pyruvate qui peut donner naissance, soit à de l'acide lactique, soit à de l'acide acétique et à de l'acide formique; soit encore à des acides lactique, acétique et carbonique. Le pH a d'ailleurs une influence sur le mode de décomposition du glucose en présence de phosphates. L'acide succinique et l'alcool éthylique ne semblent pas se former à partir de l'acide pyruvique. Le problème de leur origine reste donc à résoudre.

D'autre part, WURTZ a mis en évidence la production d'acide gluconique par certaines souches de colibacilles.

MONOD (89) dans son important travail sur la croissance des cultures bactériennes a étudié en détail le développement d'E. COLI en fonction de l'aliment carboné et a défini un rendement de croissance dans les diverses conditions réalisées.

Une nouvelle contribution a été ensuite apportée par TULASNE et WURTZ (122); ils définissent en particulier : 1°) la courbe d'utilisation carbonée déterminée par le rapport de la quantité de sucre consommée à la quantité de sucre existant à l'origine dans le milieu de culture. 2°) la courbe de croissance, ou courbe d'évolution de la densité optique en fonction du temps; elle représente en unités arbitraires la quantité de matière vivante formée. 3°) la courbe du rendement de croissance qui traduit les variations du rapport du nombre des bactéries formées (calculées en unités arbitraires) au sucre utilisé. Les auteurs précités constatent qu'il y a, en fonction de la concentration en sucre, un maximum dans le coefficient d'utilisation de cette substance; ce maximum coïncide avec un optimum de la croissance et du rendement de croissance. Il y a donc un maximum d'activité physiologique.

On sait, d'autre part, que le glucose à certaines concentrations inhibe, à son tour, l'action des sulfamides sur E. COLI (voir DELACROIX) (28).

Il paraît vraisemblable que les sulfamides - et éventuellement le phénol et l'association sulfamide-phénol - exercent une influence sur l'utilisation du glucose par E. COLI; ce fut notre

hypothèse de travail. Nous avons trouvé dans la littérature sur ce sujet fort peu de renseignements :

BRUCKE, KAINDI (16) ont remarqué que la synthèse de glycogène par la levure à partir du glucose est inhibée par les sulfamides.

LEMAY (71) a signalé que les sulfamides, d'une part, arrêtent la germination des graines et tubercules et d'autre part, empêchant la production de tubercules dans des plants de pomme de terre. Ce sont donc des enzymes présidant à la formation et à l'utilisation des glucides qui sont touchés.

2) Technique utilisée pour suivre le développement et le métabolisme bactériens dans nos essais personnels.

Développement bactérien dans des conditions expérimentales déterminées.

a) Choix du microorganisme.

Le microorganisme que nous avons choisi pour effectuer nos recherches fut : *ESCHERICHIA COLI*.

C'est un germe facile à cultiver, assez peu pathogène et sa multiplication en milieu aqueux est homogène (il ne forme pas de voile).

Il s'agissait d'une souche urinaire d'E. COLI aimablement donnée par le Laboratoire de Microbiologie, qui la désigne sous l'étiquette J dans sa collection.

Nous n'entrerons pas dans le détail des conditions de culture à réaliser pour l'étude des antibiotiques, une vue d'ensemble en a été donnée par DELMAS. A (30) et on trouvera dans la thèse de POUCHOL, (97) la mise au point de la méthode que nous avons employée au Laboratoire de Chimie de la Faculté de Pharmacie et dont nous indiquons l'essentiel.

Notre souche d'E. COLI est repiquée sur gélose en bécette de Pétri, et mise à l'étuve pendant 24 heures. Trois passages successifs de 24 Heures sur gélose inclinée, nous fournissent des colonies qui sont mises en suspension dans le milieu choisi et placées à l'étuve à 37° pendant 15 Heures. On ramène la culture à une concentration type, déterminée par opacimétrie (au spectrophotomètre Coleman) qui servira aux ensemencements dans nos expériences.

b) Milieu utilisé

Comme notre travail portait sur l'étude des sulfamides, il nous fallait choisir un milieu convenant au développement d'E. COLI, et ne contenant pas d'antisulfamides. Nous avons d'abord arrêté notre choix sur un milieu dont la source azotée était constituée par de l'urée et que TULASNE et WURTZ (121) avaient préconisé pour la culture d'E. COLI

PO4 H2 K = 1 g.
K CL = 0,50 g.
SO4 Mg = 0.50 g.
Urée = 2,15 g.
Glucose = 10 g.
Eau distillée q.s.p. 1000cc

Mais l'urée est connue pour influencer l'action des sulfamides et exercer elle-même une action bactériostatique à forte dose (52), aussi avons-nous par la suite remplacé l'urée par une quantité de sulfate d'ammonium apportant la même quantité d'azote. Ce milieu nous donnant toute satisfaction au point de vue du développement d'E. COLI et de l'action des sulfamides, nous l'avons adopté pour la plus grande partie de nos travaux. Sa composition différait de celle du milieu précédent par la source azotée, les 2,15 g. d'urée sont remplacés par 4,73 g. de sulfate d'ammonium.

c) Sulfamide utilisé

Nous avons utilisé le sulfamide dont la formule est la plus simple; le sulfanilamide ou septoplax ou II62 F ou paraaminophénylsulfamide ou paraaminobenzènesulfamide.

Nous avons utilisé des concentrations en sulfamide comprises entre 0.2 et 0.005 p. 100 qui se prêtaient aux expériences de synergie, la quantité de sulfamide présente ne devant pas, évidemment, être totalement inhibitrice par elle-même.

d) Agent associé au sulfamide.

POUCHOL (97) a montré que les phénols étaient, dans des conditions déterminées, synergiques des sulfamides. Nous nous sommes adressé au premier terme de la série C_6H_5CH pour étudier les modifications de métabolisme que l'association sulfamide phénol était susceptible d'induire chez E. COLI.

Nous avons, comme pour le sulfamide, utilisé des doses non inhibitrices par elles-mêmes, variant de 0,2 à 0,001 p. 100.

e) Mode opératoire

Nous préparons une série de fioles d'Erlenmeyer de 300cc et y plaçons 200 cm³ de milieu pur et 0,5 cm³ de la suspension d'E. COLI (préparé comme il est décrit précédemment).

Deux de ces erlens serviront de témoins, deux autres sont additionnés de 5 cm³ de solution de sulfamide faite à un titre tel que la concentration choisie soit réalisée. Deux autres erlens reçoivent du phénol en quantité suffisante pour obtenir la concentration désirée. Enfin deux erlens contiennent à la fois de la solution de sulfamide et de la solution de phénol aux doses employées précédemment.

Nous avons souvent étudié les effets de plusieurs concentrations de phénol en synergie avec la même concentration de sulfamidamide; dans ce cas, il faut faire également un essai sur le phénol employé seul aux mêmes concentrations.

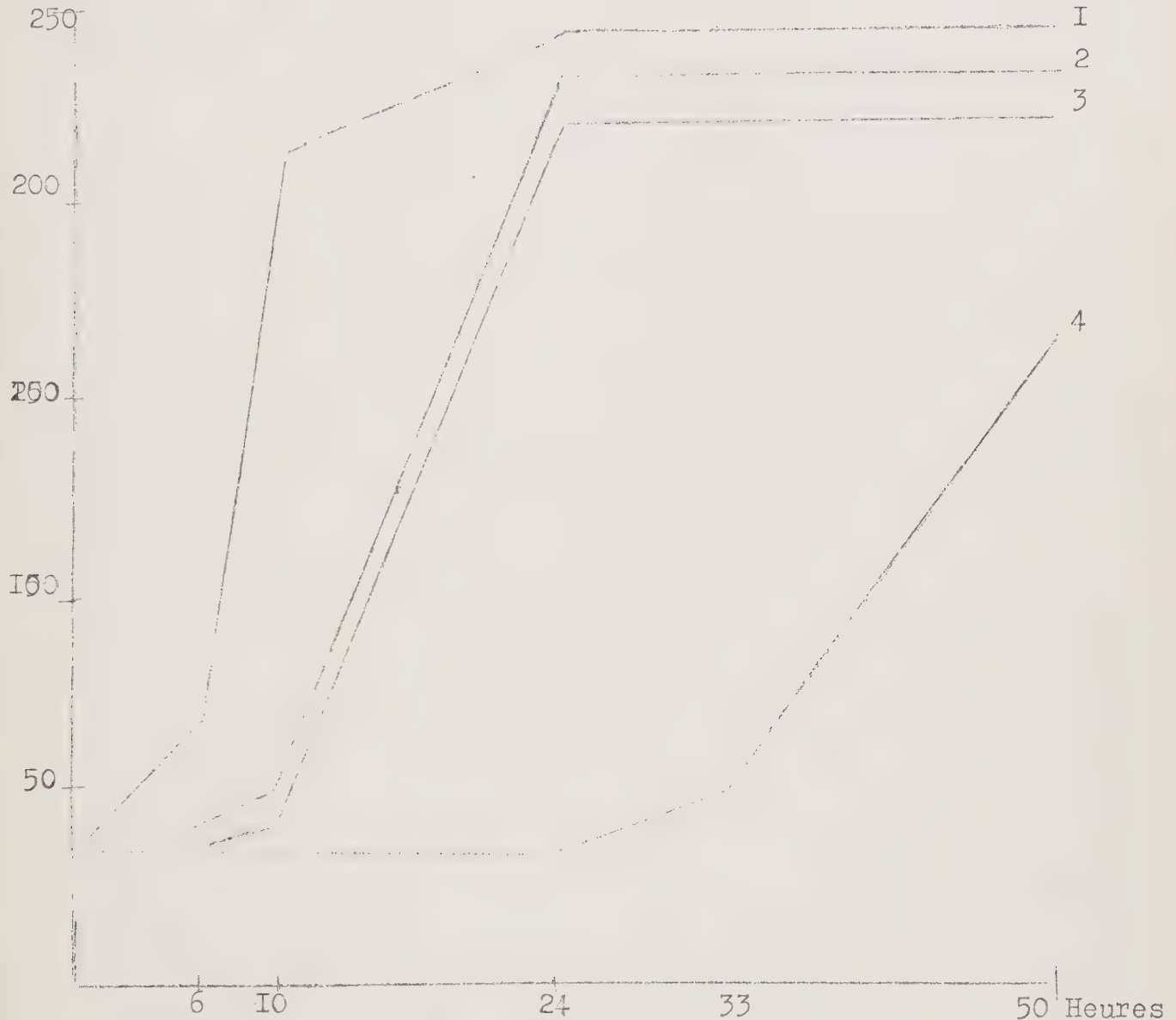
Les erlens sont placés à l'étuve; des lectures d'opacité et des déterminations chimiques ont lieu à des temps fixés, pouvant se prolonger jusqu'à 106 Heures après l'ensemencement. Ces lectures sont faites à l'aide du spectrophotomètre de Coleman ou à l'électrophotomètre de Meunier (écran coloré correspondant à une absorption maxima pour 640 milli microns).

Ce type d'expériences se heurte cependant à une grande difficulté : la non reproductibilité des résultats, bien qu'on utilise toujours la même souche d'E. COLI; on ne peut comparer entre eux que les résultats obtenus dans une série d'expériences faites simultanément, à partir d'un même ensemencement. Nous nous sommes donc astreint à effectuer chaque fois la totalité des essais (culture en milieu seul, additionné de sulfamide, de phénol et de sulfamide-phénol) à partir du même inoculat.

Ces difficultés ont été déjà rencontrées par d'autres auteurs, notamment dans l'aptitude à consommer le glucose en un temps donné, l'allure générale des phénomènes reste à peu près constante, mais il est impossible de reproduire deux fois de suite la même expérience (WURTZ, communication personnelle).

Voici (graphique p. 22) une expérience type où le développement bactérien, suivi par opacimétrie, montre les bons résultats obtenus au point de vue bactériostatique par l'association de sulfamide et de phénol à doses convenables. (Ce graphique a figuré dans une note (60) publiée antérieurement.)

divisions
du
tambour



Développement de E. COLI en milieu synthétique.

L'opacité est mesurée à l'Electrophotomètre de MEUNIER

La courbe 1 représente la croissance d'un témoin sur le milieu de culture.

La courbe 2 représente le développement d'E. COLI sur le milieu additionné de 0.01 p. 100 de sulfanilamide.

La courbe 3 représente le développement d'E. COLI sur le milieu additionné de 0.04 p. 100 de phénol.

La courbe 4 représente le développement d'E. COLI sur le milieu additionné de sulfanilamide et de phénol aux concentrations indiquées.

Etude du métabolisme bactérien dans des conditions expérimentales déterminées

Nous avons effectué systématiquement les déterminations suivantes :

Ammoniaque ou urée - Les déterminations ont été effectuées pour suivre l'utilisation de la source azotée offerte à E. COLI. L'ammoniaque a été dosée par la méthode d'entraînement décrite par YOVANOVITCH (132). L'urée a été dosée par oxydation sulfochromique de son composé di-xanthylé (26).

Glucose - Le glucose consommé est évalué par différence entre le glucose originel et le glucose restant; nous avons employé la technique de BAUDOUIN et LEWIN (7) et celle, plus spécifique de DUMAZERT (32)

Indice d'oxydation chromique - Le volume de bichromate sulfurique employé dans des conditions déterminées permet de faire la comparaison des teneurs en produits oxydables des différents milieux étudiés.

pH et Produits de dégradation du glucose -

CHAPITRE II

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - UTILISATION DE LA SOURCE AZOTEE PAR E. COLI DANS NOS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

a) Milieu contenant de l'urée - dosage de l'urée

Nous avons employé la méthode au Xanthhydrol, modifiée par ALLEN et LUCK, mise au point par L. CUNY et J. ROBERT (26)

Dans un tube à centrifuger, on introduit :

0,2 cm ³	de milieu dilué au I/10
1 cm ³	d'acide acétique
0,2 cm ³	de sol. de xanthhydrol à 5 p. 100 dans l'alcool méthylique.

On agite jusqu'à floculation, puis on laisse reposer I/2 heure. On rince alors l'agitateur et les parois du tube avec quelques cc d'alcool saturé de dixanthylurée. On centrifuge 5 à 10 minutes à 3.000 tours. On décante, on lave avec 10 cc d'alcool saturé de dixanthylurée. Nouvelle centrifugation de 10 minutes, on décante et on laisse à l'étuve à 100° pendant I/2 heure.

Dans le tube à centrifuger, on met successivement 3 cm³ de Cr₂O₇K₂ 0,33 N et 5 cm³ de SO₄H₂ pur; on laisse en contact 5 minutes, on transvase dans un erlen de 500 cm³, puis on lave avec 40 à 50 cm³ d'eau qu'on joint au liquide contenu dans l'erlen; on refroidit sous un courant d'eau quelques instants puis on ajoute 2 cm³ d'I K à 20 p. 100. On laisse en contact quelques instants; on verse 150 cm³ d'eau distillée et on titre l'iode libéré à l'aide d'hyposulfite de sodium 0,05 N en présence d'empois d'amidon ajouté à la fin du dosage. Soit N le nombre de cm³ d'hyposulfite employé. En même temps, on fait un essai à blanc (Cr₂O₇K₂ et SO₄H₂ seuls) et on dose l'iode libéré. Soit N' le nombre de cm³ d'hyposulfite employé.

L'urée en grammes par litre, est donnée par la formule

$$\frac{(N - N') \times 0,2586}{0,2}$$

Voici les résultats obtenus dans une expérience où E. COLI a été cultivé en milieu seul (T), en présence de sulfanilamide à la concentration 0,005 p. 100 (S₁) et à la concentration 0,010 p. 100 (S₂) (Tableau N° I)

temps (en heures)	T	S _I	S ₂
0 { Opacité (1)) urée (2)	34 0	34 0	34 0
3 { opacité) urée	34 0,19	34 0	34 0
7 { opacité) urée	80 0,58	49 0,46	38 0,30
24 { opacité) urée	155 0,84	143 0,71	142 0,58

(1) exprimé en division de tambour de l'électrophotomètre de Meunier.

(2) exprimée en grammes par litre.

Tableau N° I

Nous avons eu l'idée, après d'autres auteurs, de comparer le développement microbien à la quantité d'aliments consommée par le microorganisme. MONOD (89), puis TULASME et WURTZ (122) ont défini un rendement de croissance représenté par :

$$\frac{\text{substance vivante formée}}{\text{quantité de glucide consommée}}$$

Nous avons utilisé cette expression aussi bien dans le cas de la source azotée que dans celui de la source carbonée, nous référant à la terminologie de V. HENRI (d'après MONOD). Nous avons donc calculé ici la valeur du rapport :

$$\frac{\text{Densité opt. trouvée} - \text{Densité opt. du milieu au début de l'expérience}}{\text{urée consommée}}$$

La densité optique étant représentée par l'opacité mesurée à l'électrophotomètre de Meunier (Tableau N° 2).

Temps (en heures)	T	S _I	S ₂
3 H.	0	0	0
7 H.	79	33	13
24 H.	144	153	186

Tableau N° 2

Variation du rendement de croissance en fonction du temps en milieu seul (T) ou sulfamidé (S_I = 0,005 p. 100 et S₂ = 0,010 p. 100)

Pour des proliférations identiques (S_I et S₂ en 24 Heures) ou très voisine (T) les consommations d'urée diffèrent sensiblement; on en déduit que pour une même consommation d'urée, un microorganisme est capable de fabriquer plus ou moins de matière vivante, suivant les conditions.

L'expérience précédente montre qu'en présence de sulfamide après 24 H. de culture, E. COLI possède un rendement de croissance supérieur à celui obtenu en l'absence de sulfamide.

Craignant, comme nous l'avons dit, que l'urée n'interfère avec les effets des sulfamides, nous avons très rapidement abandonné le milieu de culture à l'urée. C'est pourquoi nous n'avons pas davantage étudié cette source azotée intéressante, dont nous dirons encore un mot à propos de l'utilisation du glucose dans ce même milieu.

b) Milieu contenant du sulfate d'ammonium - dosage de l'ammoniaque

Le dosage de l'ammoniaque a été fait par la méthode de YOVANOVITCH (132) en se servant de l'appareil de Parnas et Wagner

Nous avons opéré suivant le processus classique et nous avons enregistré de trop faibles variations d'ammoniaque pour que nous puissions les considérer comme utilisables dans nos travaux. Il est probable que seul l'ammoniaque nécessaire à l'édification de la matière vivante de E. COLI disparaît du milieu de culture, le reste de l'ion ammonium subsisterait inchangé dans le milieu.

II - UTILISATION DE LA SOURCE CARBONÉE.

A - DISPARITION DU GLUCOSE -

Nous avons dosé le glucose restant dans le milieu, additionné ou non d'antibiotiques, après des temps variables de culture. Nous avons vérifié qu'il n'était pas effectivement nécessaire de déféquer le milieu avant de faire le dosage, comme certains auteurs l'ont déjà montré, il suffit de le centrifuger pour éliminer les corps bactériens.

De nombreuses méthodes de dosage ont été proposées pour le dosage de glucose dans les milieux de culture (voir par exemple : (36) (II)). Nous avons adopté la méthode de Dumazert, à cause de sa spécificité, dans nos premières déterminations; par la suite, nous avons surtout employé la méthode de Baudouin et Lewin.

Méthode de Dumazert. - (32) On opère sur une prise d'essai d'une dilution au 1/10 du milieu, choisie de telle façon que la quantité de glucose contenue soit comprise entre 0,5 mg et 3 mg.

Dans un flacon bouché à l'émeri de 125 cm³ on introduit la prise d'essai puis 5 cm³ de réactif alcalinisant et 2 cm³ de solution d'iode sensiblement 0,0625 N. On laisse en contact 30 minutes. On ajoute alors 3 cm³ de SO₄ H₂ N pour libérer l'iode. On agite rapidement et on repasse en milieu sensiblement neutre par addition de 10 cm³ de solution saturée de borate de sodium. On titre I libéré par S₂ O₃ Na₂ 0,005 N.

Parallèlement on fait un essai à blanc.

Soit N le nombre de cm³ de S₂ O₃ Na₂ employé dans l'essai à blanc et N' le nombre de cm³ pour doser l'iode libéré dans l'essai, la quantité de glucose, exprimée en milligrammes, contenue dans la prise d'essai est :

$$G = (N - N') \times 0.45$$

Comme nous venons de l'indiquer, cette méthode a dû être abandonnée par la suite car la substitution du sulfate d'ammonium à l'urée, nous donnait avec la solution d'iode un précipité noir, qui se redissolvait bien par acidification, mais le dosage était entaché d'erreur.

Méthode de Baudouin et Lewin - (7). Dans un erlen de 50 cm³ on met successivement, et dans l'ordre, la prise d'essai, de l'eau en quantité suffisante pour faire 15 cm³, 1 cm³ de solution iodo mercurielle et 1 cm³ NaOH N. L'erlen est bouché par un tampon de coton, on porte au bain-marie bouillant pendant 3 minutes, on refroidit sous un courant d'eau froide. On ajoute 2 cm³ de solution sulfurique d'IO₃-K 0,05 N. On dose l'iode libéré, après contact de 30 secondes, par S₂ O₃ Na₂ 0,01 N.

Parallèlement on fait un essai à blanc.

Soit N le nombre de cm³ S₂ O₃ Na₂ O,01 N nécessaire pour doser l'Iode libéré dans le témoin et N' le nombre de cm³ utilisé pour doser l'Iode libéré dans l'essai, la quantité de glucose, exprimée en milligrammes contenue dans la prise d'essai est :

$$G = (N - N') \times 0,403$$

Résultats :

a) Milieu glucose urée -

Dans l'expérience relatée page 25 où E. COLI a été cultivé en milieu seul (T) en présence de sulfanilamide à la concentration de 0,005 p. 100 (S₁) et à la concentration 0,010 p. 100 (S₂) nous avons dosé le glucose en même temps que l'urée; voici les résultats obtenus concernant la consommation du glucose et le développement microbien que nous rappelons (Tableau N°3)

Temps (en heures)	T	S ₁	S ₂
0 (Opacité (1) Glucose consommé (2) (rendement de croissance	34 0 0	34 0 0	34 0 0
3 (Opacité Glucose consommé (rendement	34 1,35 0	34 0,45 0	34 0,45 0
7 (Opacité Glucose consommé (rendement	80 1,80 25,5	49 1,35 4,4	38 0,900 11,1
224 (Opacité Glucose consommé (Rendement	155 3,15 38,3	143 2,70 60	142 1,80 40,4

(1) Exprimée en divisions de Tambour de l'électrophotomètre de Meunier

(2) Exprimé en grammes par litre.

Tableau N° 3

Nous avons aussi essayé des concentrations plus élevées de sulfanilamide produisant une forte inhibition du développement bactérien; les chiffres expérimentaux nous ont permis de calculer les rendements de croissance suivants : (Tableau N° 4).

$\frac{\text{Densité optique}}{\text{glucose consommé}}$ (Electrophotomètre de Meunier)
(en grammes par litre).

Temps (en heures)	T	S ₃	S ₄
3	$\frac{20}{2,47} = 8$	0	0
6	$\frac{90}{2,47} = 36$	$\frac{20}{0,22} = 91$	$\frac{15}{0,22} = 68$
10	$\frac{270}{2,92} = 93$	$\frac{35}{0,67} = 52$	$\frac{22}{0,67} = 33$
24	$\frac{270}{3,6} = 75$	$\frac{55}{2,7} = 20$	$\frac{25}{3,1} = 8$

Tableau N° 4

Variation du rendement de croissance en fonction du temps, dans le milieu seul (T) ou sulfamidé, (S₃ = 0,06 p. 100 et S₄ = 0,6 p. 100)

Toutes ces expériences nous permettent de faire les constatations suivantes :

- 1°) Durant sa multiplication le germe montre un rendement de croissance variable.
- 2°) En présence de sulfanilamide, tant qu'il y a bactériostase, le rendement est en général faible et subit également des variations.

pour S₁ et S₂ à la 7^è heure, les rendements sont 4,4 et 11,1, celui du témoin étant 25

pour S₃ et S₄ à la 24^è heure, les rendements sont 20 et 8, celui du témoin étant 75.

Dès que la bactériostase est levée, le rendement dans le milieu sulfamidé devient même supérieur à celui du milieu témoin; pour S_1 et S_2 à la 24ème heure, les rendements sont 40,4 et 60, celui du témoin étant 38,3.

3°) Si on diminue beaucoup la vitalité du colibacille par l'emploi d'une forte concentration en sulfamide, on n'empêche pas la consommation du glucose.

Donc une variation de croissance n'entraîne pas forcément une variation de la consommation de glucose, l'élaboration de la matière vivante n'employant qu'un poids de carbone infime, au regard du carbone offert et du glucose consommé.

Le sulfamide, malgré le retard de multiplication observé, provoque parfois une consommation de glucose supérieure à celle du témoin : au bout de 24 Heures, la consommation de glucose est sensiblement la même pour T S_3 et S_4 mais l'opacité de T est considérable (270) celles de S_3 et S_4 sont faibles (55 et 25).

Nous avons insisté sur l'obligation de ne comparer entre eux que les résultats obtenus dans une même série d'expériences. Nous illustrerons ce point de technique important par un exemple emprunté à des cultures d'E. COLI en milieu synthétique seul.

Deux expériences faites sur une même souche d'E. COLI, mais à des moments différents nous ont donné les résultats suivants : (Tableau N° 5).

Temps (en heures)	Expérience 1	Expérience 2
0 { Opacité (1) glucose consommé (2) rendt. (3)	0 0 0	0 0 0
3 { Opacité gluc. cons. rendt.	0 1,35 0	20 2,47 8
6 { opacité gluc. cons. rendt.		90 2,47 36,4
7 { opacité gluc. cons. rendt.	46 1,80 25,5	
10 { opacité gluc. cons. rendt.		270 2,92 92,3
24 { opacité gluc. cons. rendt.	121 3,15 38,3	260 3,60 75

- (1) exprimée en divisions de tambour de l'électrophotomètre de Meunier
 (2) exprimé en grammes par litre
 (3) rendement de croissance.

Tableau N° 5

On voit que pour des rendements de croissance très voisins 38,3 et 36,4, les quantités de glucose consommé ont été différentes dans les 2 cas (3,15 g. et 2,47 g.) et les temps nécessaires pour arriver à ce résultat ont varié encore davantage (24 h. et 6 h.) d'autre part, à des consommations de glucose presque identiques (3,15 et 2,92) correspond l'existence d'une population beaucoup plus importante dans le 2^o essai (opacité 270) que dans le 1^o (opacité 121).

b) Milieu glucose-sulfate d'ammonium.-

Nous indiquerons d'abord tous les détails d'une expérience Dans les essais qui suivront, seuls seront mentionnés les résultats de l'analyse chimique.

Voici cette expérience : E. COLI est ensemencé dans 10 fioles d'Erlenmeyer, réparties en deux séries, contenant respectivement dans chaque série : le milieu synthétique seul (T), le même milieu additionné de sulfanilamide aux concentrations suivantes :

0,2 p.100 (S_I) 0,1 p.100 (S₂) 0,02 p.100 (S₃) 0,01 p.100 (S₄)

Le développement microbien a été observé pendant 106 Heures les lectures d'opacité (à l'électrophotomètre de Meunier) et les dosages de glucose sont fait au bout de 3, 6, 9, 13 $\frac{1}{2}$, 25, 52, 106 H.

Voici les chiffres obtenus dans la première série de cette expérience (Tableau N°6).

Temps (en heures)	T	S _I	S ₂	S ₃	S ₄
3 { opacité (1) gluc.cons (2) rendt. (3)	3 2.58 1.1	3 1.77 1.7	3 1.77 1.7	3 1.77 1.7	3 2.58 1.1
6 { opacité gluc. cons. rendt.	25 2.74 9.5	3 2.10 1.4	3 1.83 1.6	3 1.83 1.6	5 2.58 1.9
9 { opacité gluc. cons. rendt.	70 4.59 15	4 2.58 1.5	4 2.32 1.7	7 3.00 2.3	7 3.00 2.3
13 $\frac{1}{2}$ { opacité gluc.cons. rendt.	70 4.59 15	7 3.79 1.8	4 2.99 1.3	7 3.39 2	10 3.55 2.8
25 { opacité gluc. cons. rendt.	70 4.59 15	7 3.79 1.8	5 3.00 1.7	9 3.79 2.6	60 4.10 14.6
52 { opacité gluc. cons. rendt.	85 5.00 17	43 3.79 11.3	27 3.39 8	77 3.79 20	95 5.00 19
106 { opacité gluc. cons. rendt.	87 5.00 17	90 3.79 26	120 3.39 35	92 3.79 24	115 5.00 23

Tableau N° 6

(1) exprimée en divisions de tambour de l'électrophotomètre de Meunier
 (2) glucose consommé exprimé en grammes par litre.
 (3) rendement de croissance.

Et voici (Tableau N°6 bis) la consommation du glucose dans la seconde série de l'expérience :

temps (en heures)	T	S _I	S ₂	S ₃	S ₄
3	2.58	2.58	1.77	1.77	1.77
6	2.74	2.58	1.77	1.77	2.10
9	4.35	2.99	2.99	2.34	3.40
13.30	5.81	3.50	2.99	2.99	4.19
25	6.21	5.50	3.79	2.99	5.16
52	6.21	5.50	4.19	3.40	5.16
106	6.21	5.50	4.19	3.40	5.16

Tableau N° 6 bis

Consommation du glucose en grammes par litre.

Nous constatons dans cette expérience :

- 1°) un effet bactériostatique très net du sulfamide utilisé aux concentrations supérieures ou égales à 0,02 p. 100, se manifestant jusqu'à la 25 ème heure de culture.
- 2°) Pendant la phase de latence E. COLI consomme des quantités notables de glucose sans synthétiser de matière vivante de façon appréciable; la phase de latence étant prolongée par l'emploi de sulfamide, la quantité de glucose qui disparaît ainsi du milieu est importante (3 g.55 sur les 10 g. de glucose contenus dans un litre de milieu). C'est la première phase signalée par GREY (47), première phase qui est considérablement prolongée en présence de sulfamide.

Le métabolisme d'E. COLI en phase de latence nous semble donc présenter des analogies avec celui d'une suspension bactérienne non proliférante : il y a conversion d'une partie du glucose en produits intermédiaires, mais les produits synthétisés ne sont pas assimilés et il ne s'ensuit aucune augmentation de matière vivante (4).

Puis E. COLI se développe en continuant à consommer du glucose. Enfin, les dernières phases de multiplication en présence de sulfamide se font sans disparition notable de glucose; au contraire, en l'absence de sulfamide, tant qu'il y a développement bactérien décelable par opacimétrie, il y a diminution du glucose restant (Tableau N°6).

- 3°) A la 106 ème heure, il y a, en présence de toutes les doses de sulfamide employées, une multiplication microbienne plus importante que dans la culture témoin.

Ces résultats nous apparaissent encore plus clairement, si nous calculons les valeurs du rendement microbien en fonction du glucose consommé, c'est-à-dire le rendement de croissance (défini par MONOD, et par TULASNE et WURTZ). Ce rendement est faible tant qu'il y a bactériostase. Il augmente dès que celle-ci cesse et devient alors supérieur à celui de la culture témoin.

Les résultats obtenus avec le milieu synthétique au sulfate d'ammonium sont donc superposables à ceux que nous a fournis le milieu à l'urée.

Mais nous remarquerons que dans le milieu à l'urée, il y a eu économie de glucose, comme si E. COLI consommait moins de glucose en présence d'urée qu'en présence d'un sel ammoniacal. On pourrait penser que l'urée sert de source de carbone comme elle sert de source d'azote; cependant TULASNE et WURTZ ont montré que, tout au moins lorsqu'elle est seule, l'urée ne peut servir de source de carbone pour le colibacille (121).

B - INDICE CHROMIQUE.-

Le fait que les dernières phases de multiplication que nous avons observées se passent sans consommation de glucose en présence de sulfamide a particulièrement attiré notre attention. Nous avons pensé que E. COLI vivait alors aux dépens des produits de clivage du glucose disparu. GREY signale d'ailleurs l'utilisation par E. COLI des produits formés, et O'MEARA et ses collaborateurs (d'après FORREST et WALKER (35)), ont pensé que, durant la phase logarithmique de croissance, il se formait de la réductone $\text{CHO} - \text{C}(\text{OH}) = \text{CH}(\text{OH})$. Cette réductone serait stabilisée dans le milieu par P.A.B., donc stockée et pourrait être utilisée ultérieurement.

Pour déceler la présence et la disparition des produits de dégradation du glucose, nous nous sommes adressé au pouvoir de réduction du milieu de culture vis à vis du bichromate de potassium. Nous avons donc déterminé l'indice chromique (I.C.) nous inspirant en cela du travail de LEFEVRE (70).

Rappelons que I.C. est défini comme étant la quantité de solution de bichromate de potassium 0,1 N (exprimée en cm^3) réduite par un poids déterminé de substance connue (ou par un volume déterminé d'une solution). Dans le cas présent, avant l'ensemencement, I.C. est dû au glucose et aussi au phénol s'il y a lieu; par contre, le sulfamide n'intervient pas dans nos conditions expérimentales. Lorsque la culture se développe, des produits de dégradation du glucose apparaissent et leur pouvoir réducteur peut différer de celui de la substance originelle.

I - Technique utilisé.-

Le milieu de culture est dilué au 1/10; nous en prélevons en général 2 cm^3 (correspondant à 0,2 cm^3 de milieu) et nous les plaçons dans une fiole de Kjeldahl de 30 cm^3 avec une quantité d'eau suffisante pour faire 5 cm^3 ; puis 10 cm^3 de solution sulfochromique 0,1 N. Nous préparons cette solution en ajoutant à 200 cm^3 de solution aqueuse de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ à 25,50 g. par litre, 550 cm^3 de SO_4H_2 pur et de l'eau distillée en quantité suffisante pour obtenir 1000 cm^3 .

Nous mettons les essais au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Des dosages préliminaires nous ont montré que ce temps était suffisant, bien que LEFEVRE (70) dans ses expériences l'eût porté à 1 heure. Nous refroidissons sous un courant d'eau. Après refroidissement, nous transvasons dans un erlen de 250 à 300 cm^3 ; nous rinçons la fiole de Kjeldahl trois fois avec 10 à 15 cm^3 d'eau distillée, nous réunissons les eaux de lavages avec le contenu du Kjeldahl dans l'erlen; à ce moment, nous ajoutons 5 cm^3 de solution de I K à 25 p. 100, nous agitons une minute et nous dosons l'Iode libéré avec $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 0,1 N. Nous faisons parallèlement un essai à blanc;

soit V le nombre de cm³ de la prise d'essai

soit N le nombre de cm³ de S₂ O₃ Na₂ O, I N pour décolorer l'iode libéré dans le témoin,

et N' le nombre de cm³ de S₂ O₃ Na₂ O, I N pour décolorer l'iode libéré dans l'essai

L'indice chromique pour 10 cm³ de milieu est :

$$I C = \frac{(N - N') \times 10}{V}$$

2) Variations de l'indice chromique au cours du développement

bactérien et en présence de différentes doses de sulfanilamide

Dans l'expérience précédente (page 32) (culture d'E. COLI en présence de sulfanilamide), nous avons accompagné chaque dosage de glucose d'une détermination de l'Indice Chromique. Nous avons rapproché dans le Tableau N° 7 les résultats du dosage du glucose et de l'indice chromique (I.C.) faits simultanément. Les variations extrêmement importantes notées dans cette expérience ne se sont pas retrouvées ultérieurement avec pareille ampleur, nous ne pouvons cependant pas ne pas les citer.

Temps en heures :	T	S _I	S ₂	S ₃	S ₄
0	$\frac{983}{136} = 7.2$	7.2	7.2	7.2	7.2
3	$\frac{725}{180} = 4.0$	$\frac{806}{180} = 4.4$	$\frac{806}{180} = 4.4$	$\frac{806}{180} = 4.4$	$\frac{725}{180} = 4.0$
6	$\frac{709}{136} = 5.2$	$\frac{773}{180} = 4.3$	$\frac{800}{180} = 4.4$	$\frac{800}{180} = 4.4$	$\frac{725}{176} = 4.1$
9	$\frac{524}{128} = 4.1$	$\frac{725}{168} = 4.3$	$\frac{751}{160} = 4.7$	$\frac{683}{160} = 4.3$	$\frac{683}{180} = 3.7$
13	$\frac{525}{120} = 4.4$	$\frac{604}{168} = 3.6$	$\frac{684}{160} = 4.3$	$\frac{644}{143} = 4.5$	$\frac{628}{180} = 3.5$
25	$\frac{524}{120} = 4.4$	$\frac{604}{160} = 3.8$	$\frac{683}{140} = 4.9$	$\frac{604}{142} = 4.3$	$\frac{573}{120} = 4.8$
52	$\frac{483}{108} = 4.5$	$\frac{604}{148} = 4.0$	$\frac{644}{133} = 4.8$	$\frac{604}{128} = 4.7$	$\frac{483}{116} = 4.2$
106	$\frac{483}{100} = 4.8$	$\frac{604}{148} = 4.0$	$\frac{644}{133} = 4.8$	$\frac{604}{116} = 5.2$	$\frac{483}{108} = 4.3$

Tableau N° 7

Variation, en fonction du temps, du rapport glucose restant dans le milieu de culture pur (T) Indice Chromique
ou additionné de sulfamide aux concentrations 0.2 p. 100 (S_I);
0.1 p. 100 (S₂); 0.02 p. 100 (S₃); 0.01 p. 100 (S₄).
Le glucose est exprimé en 10⁻⁴ g. pour 10 cm³ et l'I.C. est exprimé en cm³ de solution 0,1 N pour 10 cm³.

Nous voyons, dans la variation de l'I.C., trois phases se superposant à celles de la variation du glucose dans le milieu. Durant les premières heures de culture (3h. pour le témoin, 6 h. et 9 h. pour les cultures en présence de sulfamide) l'I.C. s'élève, atteint une valeur maxima - la même pour tous les essais. Cette augmentation se produit alors que du glucose disparaît.

Dans une deuxième phase, la quantité de glucose restant continue à baisser, l'I.C. s'abaisse également.

En fin, dans la troisième phase, où E.COLI se multiplie en présence de sulfanilamide sans consommation de glucose, l'I.C. continue à diminuer.

Ces résultats peuvent encore s'exprimer de la façon suivante :

En l'absence de sulfanilamide, dès que la multiplication commence, l'I.C. diminue.

Cette même diminution s'observe en présence du sulfamide quand le colibacille commence à s'y développer, c'est-à-dire au bout d'un temps d'autant plus long que la concentration en sulfamide est plus élevée.

En d'autres termes, avant toute multiplication apparente, il y a augmentation des produits responsables de l'élévation d'I.C., puis disparition de ces produits pendant la croissance bactérienne rapide. Les dernières phases de multiplication observées se font donc aux dépens de ces produits puisque, comme le montre le tableau N° 7, le glucose n'est plus touché à ce moment.

MONOD (90) avait remarqué que des cultures peuvent respirer après la fin de la croissance aux dépens de substances dérivées du glucose et concluait "au cours du métabolisme aérobie des glucides (au moins certains) par E. COLI, il se forme des produits d'oxydation incomplète que la culture peut encore oxyder secondairement, mais ne paraissant pas utilisables pour les synthèses".

3) - Variations de l'Indice Chromique et consommation du glucose en présence de phénol et de l'association sulfamide-phénol.

Le but de nos travaux étant de rechercher s'il y avait perturbation du métabolisme hydrocarboné en présence de l'association synergique du sulfamide et du phénol aux concentrations qui avaient donné le meilleur effet bactériostatique au Laboratoire (voir POUCHOL (97)), nous avons fait de nombreuses séries d'expériences où à une même dose de sulfamide sont associées diverses doses de phénol. Nous avons dosé glucose et I.C. dans le milieu ne contenant que du phénol ou contenant l'association sulfamide-phénol.

Les résultats sont consignés dans les Tableaux N° 8, 9, 10 II où figurent des fractions dont le numérateur est le glucose restant G exprimé en 10^{-4} g. pour 10 cm³ et le dénominateur est l'indice chromique, I.C., exprimé en cm³ de solution de bichromate 0,1 N pour 10 cm³ de milieu. Nous avons pensé mettre ainsi mieux en évidence le rapport de ces données expérimentales. Nous avons cherché aussi à exprimer les résultats sous une autre forme, en calculant I.C. résiduel, c'est-à-dire la réduction après défalcation de la quantité de bichromate que le glucose serait capable de consommer. Mais les chiffres obtenus n'apportant pas de renseignements supplémentaires ne sont pas consignés dans ce travail.

Voici les tableaux récapitulatifs de 4 séries d'expériences. Les concentrations en sulfamide ont été 0.02 p. 100 (Tableaux N° 8 et 9) ou 0,01 pour 100 (Tableaux N° 10 et 11). Les concentrations en phénol ont été désignées par les lettres P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆, et leur valeur a été explicitée dans chacun des tableaux. Le symbole S + P désigne l'association [sulphamide-phénol], S + P₄, par exemple, représente l'association du sulfamide à la concentration S avec du phénol à la concentration P₄.

TABLEAU N° 8

Variation du rapport Glucose restant en fonction du
Indice Chromique
temps, dans le milieu seul (T)
ou additionné de sulfanilamide à la concentration de 0,02 p. 100 (S)
ou additionné de phénol aux concentrations 0,02 p. 100 (P₁)
0,01 p. 100 (P₂)
0,004 p. 100 (P₃)
0,002 p. 100 (P₄)
0,001 p. 100 (P₅)
ou additionné de sulfanilamide et de phénol aux concentrations
indiquées.

Le glucose est exprimé en 10⁻⁴ G. pour 10 cm³ de milieu,
et I.C. en cm³ de solution 0,1 N de bichromate de potassium pour
10 cm³ de milieu.

Temps en heures	T	S	P _I	P ₂	P ₃	P ₄
0	$\frac{925}{125} = 7.4$	$\frac{886}{125} = 7$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{145} = 6.1$
3	$\frac{886}{115} = 7.7$	$\frac{886}{115} = 7.7$	$\frac{886}{145} = 6.1$	$\frac{886}{145} = 6.1$	$\frac{886}{135} = 6.6$	$\frac{886}{135} = 6.6$
6	$\frac{846}{115} = 7.4$	$\frac{886}{115} = 7.7$	$\frac{886}{145} = 6.1$	$\frac{886}{145} = 6.1$	$\frac{886}{135} = 6.6$	$\frac{886}{130} = 6.8$
11	$\frac{725}{115} = 6.3$	$\frac{800}{115} = 6.9$	$\frac{800}{140} = 5.7$	$\frac{800}{145} = 5.5$	$\frac{800}{135} = 5.9$	$\frac{763}{130} = 5.9$
25	$\frac{645}{100} = 6.4$	$\frac{800}{120} = 6.6$	$\frac{725}{135} = 5.3$	$\frac{725}{130} = 5.6$	$\frac{725}{125} = 5.8$	$\frac{644}{120} = 5.4$

Temps en heures	P ₅	S + P _I	S + P ₂	S + P ₃	S + P ₄	S + P ₅
0	$\frac{886}{145} = 6.1$	$\frac{886}{155} = 5.7$	$\frac{886}{155} = 5.7$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{140} = 6.3$
3	$\frac{886}{130} = 6.8$	$\frac{886}{145} = 6.1$	$\frac{886}{145} = 6.1$	$\frac{886}{135} = 6.6$	$\frac{886}{135} = 6.6$	$\frac{886}{130} = 6.8$
6	$\frac{886}{130} = 6.8$	$\frac{886}{140} = 6.3$	$\frac{846}{140} = 6.0$	$\frac{846}{140} = 6.0$	$\frac{846}{135} = 6.2$	$\frac{846}{130} = 6.5$
11	$\frac{763}{130} = 5.9$	$\frac{800}{140} = 5.7$	$\frac{846}{140} = 6.0$	$\frac{846}{140} = 6.0$	$\frac{800}{135} = 5.9$	$\frac{725}{130} = 5.7$
25	$\frac{644}{120} = 5.4$	$\frac{725}{140} = 5.2$	$\frac{644}{135} = 4.8$	$\frac{644}{130} = 5.0$	$\frac{644}{125} = 5.1$	$\frac{644}{125} = 5.1$

TABLEAU N° 9

Variation du rapport $\frac{\text{Glucose restant}}{\text{Indice chromique}}$ en fonction du temps,

dans le milieu seul (T)

Ou additionné de sulfanilamide à la concentration de 0,02 p.100 (S)

Ou additionné de phénol aux concentrations de 0,125 p.100 (P₁)
0,100 p.100 (P₂)
0,08 p. 100 (P₃)
0,066p. 100 (P₄)
0,058 p.100 (P₅)
0, 05p. 100 (P₆)

Ou additionné de sulfanilamide et de phénol aux concentrations indiquées.

Temps en heures	T	S	P _I	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅
0	$\frac{926}{125} = 7.4$	$\frac{886}{125} = 7.0$	$\frac{886}{155} = 5.7$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{145} = 6.1$
3	$\frac{685}{130} = 5.3$	$\frac{846}{130} = 6.5$	$\frac{806}{145} = 5.5$	$\frac{725}{145} = 5.0$	$\frac{725}{140} = 5.2$	$\frac{685}{135} = 5.1$	$\frac{685}{130} = 5.3$
6	$\frac{644}{125} = 5.4$	$\frac{668}{115} = 5.8$	$\frac{806}{145} = 5.5$	$\frac{725}{145} = 5.0$	$\frac{725}{140} = 5.2$	$\frac{644}{135} = 4.7$	$\frac{644}{125} = 5.1$
10	$\frac{443}{110} = 4.0$	$\frac{564}{105} = 5.4$	$\frac{508}{145} = 3.5$	$\frac{443}{135} = 3.3$	$\frac{443}{130} = 3.4$	$\frac{523}{125} = 4.2$	$\frac{403}{110} = 3.6$
26	$\frac{561}{100} = 5.6$	$\frac{564}{100} = 5.6$	$\frac{644}{125} = 5.1$	$\frac{644}{120} = 5.4$	$\frac{644}{120} = 5.4$	$\frac{685}{115} = 5.9$	$\frac{685}{115} = 5.9$
33	$\frac{685}{95} = 7.2$	$\frac{685}{95} = 7.2$	$\frac{685}{125} = 5.5$	$\frac{685}{120} = 5.7$	$\frac{685}{120} = 5.7$	$\frac{685}{110} = 6.2$	$\frac{523}{110} = 4.7$
50	$\frac{762}{95} = 8.1$	$\frac{765}{95} = 8.1$	$\frac{765}{125} = 6.1$	$\frac{765}{120} = 6.4$	$\frac{765}{125} = 6.1$	$\frac{765}{110} = 7.0$	$\frac{725}{110} = 6.6$

Temps en heures	P ₆	S+P _I	S+P ₂	S+P ₃	S+P ₄	S+P ₅	S+P ₆
0	$\frac{886}{140} = 6.3$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{150} = 5.9$	$\frac{886}{145} = 6.1$	$\frac{886}{140} = 6.3$	$\frac{886}{137} = 6.5$	$\frac{886}{137} = 6.5$
3	$\frac{685}{130} = 5.3$	$\frac{685}{155} = 4.4$	$\frac{685}{150} = 4.5$	$\frac{685}{150} = 4.5$	$\frac{685}{150} = 4.5$	$\frac{685}{145} = 4.7$	$\frac{685}{140} = 4.9$
6	$\frac{644}{125} = 5.1$	$\frac{765}{155} = 4.9$	$\frac{765}{150} = 5.1$	$\frac{765}{150} = 5.1$	$\frac{685}{145} = 4.7$	$\frac{685}{140} = 4.9$	$\frac{685}{135} = 5.1$
10	$\frac{403}{105} = 3.8$	$\frac{806}{150} = 5.3$	$\frac{806}{150} = 5.3$	$\frac{806}{145} = 5.5$	$\frac{806}{140} = 5.7$	$\frac{765}{135} = 5.6$	$\frac{523}{120} = 4.3$
26	$\frac{685}{110} = 6.2$	$\frac{685}{140} = 4.9$	$\frac{685}{140} = 4.9$	$\frac{485}{135} = 3.6$	$\frac{485}{135} = 3.6$	$\frac{485}{135} = 3.6$	$\frac{483}{120} = 4.0$
33	$\frac{523}{110} = 4.7$	$\frac{765}{140} = 5.4$	$\frac{765}{135} = 5.6$	$\frac{765}{125} = 6.1$	$\frac{725}{125} = 5.8$	$\frac{725}{125} = 5.8$	$\frac{644}{115} = 5.6$
50	$\frac{725}{110} = 6.6$	$\frac{765}{135} = 5.7$	$\frac{765}{130} = 5.9$	$\frac{765}{120} = 6.4$	$\frac{765}{120} = 6.4$	$\frac{725}{120} = 6.0$	$\frac{725}{115} = 6.3$

TABLEAU N° 10

Variation du rapport $\frac{\text{Glucose restant}}{\text{Indice chromique}}$ en fonction du temps,
dans le milieu seul (T)

ou additionné de sulfanilamide à la concentration de 0,01 p. 100(S)

ou additionné de phénol aux concentrations de 0.044 p. 100 (P₁)

0.040 p. 100 (P₂)

0,036 p. 100 (P₃)

0.033 p. 100 (P₄)

0.030 p. 100 (P₅)

0.028 p. 100 (P₆)

ou additionné de sulfanilamide et de phénol aux concentrations
indiquées.

Temps en heures	T	S	P _I	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆
0	$\frac{1007}{130} = 7.7$	$\frac{967}{130} = 7.4$	$\frac{967}{140} = 6.9$	$\frac{967}{140} = 6.9$	$\frac{967}{140} = 6.9$	$\frac{967}{140} = 6.9$	$\frac{967}{140} = 6.9$	$\frac{967}{140} = 6.9$
3	$\frac{846}{130} = 6.5$	$\frac{886}{125} = 7.1$	$\frac{886}{135} = 6.5$	$\frac{886}{135} = 6.5$	$\frac{886}{135} = 6.5$	$\frac{886}{135} = 6.5$	$\frac{886}{135} = 6.5$	$\frac{886}{135} = 6.5$
7	$\frac{725}{125} = 5.8$	$\frac{885}{125} = 7.1$	$\frac{806}{135} = 6.0$	$\frac{806}{135} = 6.0$	$\frac{806}{135} = 6.0$	$\frac{806}{135} = 6.0$	$\frac{806}{135} = 6.0$	$\frac{806}{130} = 6.2$
11	$\frac{644}{125} = 5.1$	$\frac{886}{125} = 7.1$	$\frac{644}{130} = 5.0$	$\frac{765}{130} = 5.9$	$\frac{725}{130} = 5.6$	$\frac{765}{130} = 5.9$	$\frac{765}{130} = 5.9$	$\frac{644}{125} = 5.1$
24	$\frac{644}{120} = 5.4$	$\frac{523}{120} = 4.4$	$\frac{765}{120} = 6.4$	$\frac{765}{120} = 6.4$	$\frac{725}{120} = 6.0$	$\frac{725}{120} = 6.0$	$\frac{725}{120} = 6.0$	$\frac{644}{120} = 5.4$

Temps en heures	S P _I	S+P ₂	S+P ₃	S+P ₄	S+P ₅	S+P ₆
0	$\frac{967}{135} = 7.2$	$\frac{967}{135} = 7.2$	$\frac{967}{135} = 7.2$	$\frac{967}{135} = 7.2$	$\frac{967}{135} = 7.2$	$\frac{967}{135} = 7.2$
3	$\frac{886}{130} = 6.8$	$\frac{886}{130} = 6.8$	$\frac{886}{130} = 6.8$	$\frac{886}{130} = 6.8$	$\frac{886}{130} = 6.8$	$\frac{886}{130} = 6.8$
7	$\frac{846}{130} = 6.5$	$\frac{846}{130} = 6.5$	$\frac{846}{130} = 6.5$	$\frac{846}{130} = 6.5$	$\frac{846}{130} = 6.5$	$\frac{846}{130} = 6.5$
II	$\frac{846}{125} = 6.8$	$\frac{846}{125} = 6.8$	$\frac{806}{125} = 6.4$	$\frac{806}{125} = 6.4$	$\frac{806}{125} = 6.4$	$\frac{806}{125} = 6.4$
24	$\frac{604}{125} = 4.8$	$\frac{644}{125} = 5.1$	$\frac{644}{125} = 5.1$	$\frac{604}{120} = 5.0$	$\frac{604}{120} = 5.0$	$\frac{623}{120} = 4.4$

TABLEAU N° II

Variation du rapport $\frac{\text{Glucose restant}}{\text{Indice chromique}}$ en fonction du temps

dans le milieu seul (T)

ou additionné de sulfanilamide à la concentration de 0.01 p. 100 (S)

ou additionné de phénol aux concentrations de 0.044 p. 100 (P₁)

0.040 p. 100 (P₂)

0.036 p. 100 (P₃)

0.033 p. 100 (P₄)

0.030 p. 100 (P₅)

0.028 p. 100 (P₆)

ou additionné de sulfanilamide et de phénol aux concentrations indiquées.

Temps en heures	T	S	PI	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅
0	$\frac{967}{130} = 7.4$	$\frac{967}{127} = 7.6$	$\frac{967}{145} = 6.6$	$\frac{967}{145} = 6.6$	$\frac{967}{145} = 6.6$	$\frac{967}{145} = 6.6$	$\frac{967}{145} = 6.6$
3	$\frac{886}{125} = 7.1$	$\frac{886}{125} = 7.1$	$\frac{967}{135} = 7.2$	$\frac{967}{135} = 7.2$	$\frac{967}{135} = 7.2$	$\frac{886}{135} = 6.6$	$\frac{886}{135} = 6.6$
6	$\frac{806}{115} = 7.0$	$\frac{838}{120} = 7.0$	$\frac{806}{130} = 6.2$	$\frac{806}{130} = 6.2$	$\frac{725}{130} = 5.6$	$\frac{725}{127} = 5.8$	$\frac{725}{127} = 5.8$
10	$\frac{693}{105} = 6.6$	$\frac{725}{112} = 6.5$	$\frac{725}{132} = 5.5$	$\frac{644}{132} = 5.0$	$\frac{725}{132} = 5.5$	$\frac{725}{132} = 5.5$	$\frac{725}{130} = 5.6$
24	$\frac{564}{100} = 5.6$	$\frac{564}{97.5} = 5.7$	$\frac{564}{105} = 5.4$	$\frac{564}{105} = 5.4$	$\frac{564}{120} = 4.5$	$\frac{644}{115} = 5.6$	$\frac{644}{120} = 5.4$
33	$\frac{564}{100} = 5.6$	$\frac{564}{90} = 6.3$	$\frac{564}{105} = 5.4$	$\frac{564}{105} = 5.4$	$\frac{564}{105} = 5.4$	$\frac{564}{95} = 6.0$	$\frac{564}{95} = 6.0$
72	$\frac{564}{100} = 5.6$	$\frac{483}{80} = 6.0$	$\frac{564}{105} = 5.4$	$\frac{564}{105} = 5.4$	$\frac{564}{105} = 5.4$	$\frac{564}{100} = 5.6$	$\frac{564}{100} = 5.6$

[illegible]

En étudiant ces tableaux, on remarque que diverses éventualités se sont présentées au cours de ces expériences, dont nous avons déjà publié une analyse sommaire (59).

a) LE RAPPORT G/I.C. S'ABAISSSE.

C'est le cas général, qu'il s'agisse du témoin, du sulfamide, du phénol ou de leurs associations. Mais notons que cet abaissement peut n'être que transitoire (ex. Tableau N° 10, observations à 24 H.)

Cet abaissement du rapport peut avoir lieu pour deux raisons différentes :

I.C. a moins diminué que G., cela prouve que des produits du métabolisme intermédiaire relativement peu oxydés se sont accumulés.

En voici quelques exemples :

Tableau N° 8 : en 25 H. dans la culture témoin le glucose passe de 9.26 g. à 6.45 et l'I.C. de 125 à 100, le rapport s'abaisse de 7.8 à 6.4.

En présence de 0.02 p. 100 de sulfamide, le glucose passe de 8.86 g. à 8 g. et I.C. de 125 à 120, le rapport s'abaisse de 7 à 6.9 (ce qui est insignifiant).

En présence de 0.02 p. 100 de phénol P1, le glucose passe de 8.86 g. à 7.25 g. et I.C. de 150 à 135, le rapport s'abaisse de 5.9 à 5.3.

Et en présence de l'association S + P1, le glucose passe de 8.86 g. à 7.25 g. et I.C. de 155 à 140, le rapport s'abaisse de 5.9 à 5.1.

Tableau N° 9 : Dans la culture témoin, le glucose passe en 10 H. de la valeur 9.26 g. à 4.43 g. I.C. (pour 10 cm³) passant de 125 à 110, si bien que le rapport $\frac{G}{I.C.}$ s'abaisse de 7.4 à 4.0

En présence de 0.02 p. 100 de sulfamide, le glucose initial 8.86 g. s'abaisse à 5.64 g., I.C. variant de 125 à 105 et le rapport passant de 7.0 à 5.4

En présence de 0.05 p. 100 de phénol (P₆) le glucose passe de 8.86 g. à 4.03 g., I.C. s'abaisse de 140 à 105 et le rapport passe de 6.3 à 3.8

En présence de l'association sulfamide-phénol (S+P₆) le glucose passe de 8.86 g. à 5.23 g., I.C. passe de 137 à 120 et le rapport de 6.5 à 4.3

Dans les deux autres tableaux, on peut voir également cet abaissement du rapport G/I.C. dans certains cas.

On ne peut différencier par la valeur de cet abaissement, les cultures faites en présence ou absence d'antibiotiques; autrement dit, dans les conditions expérimentales réalisées, il n'y a pas eu de perturbations nettement caractérisées du métabolisme glucidique.

G. a diminué, I.C. est resté constant. - La présence de produits relativement plus oxydés que le glucose pourrait rendre compte de cette apparente fixité de I.C. malgré l'appauvrissement du milieu en glucose. Ce cas n'est au fond qu'une accentuation du cas précédent. C'est le glucose qui est responsable, dans le tableau N° 8 de l'abaissement du rapport de 7,7 à 6,3 dans la culture témoin entre la 3^{ème} et la 11^{ème} heure. I.C. est en effet resté fixé à 115, le glucose passant de 8,86 g. à 7,25 g.

Pendant le même temps,
En présence de 0,02 p. 100 de sulfamide, le glucose passe de 8,86 g. à 8 g. I.C. restant égal à 115, le rapport s'abaisse de 7,7 à 6,9.

En présence de 0,001 p. 100 de phénol (P₅), le glucose passe de 8,86 à 7,63 g., I.C. restant égal à 130, le rapport descend de 6.8 à 5.9.

En présence de l'association sulfamide-phénol (S+P₅), le glucose passe de 8,86 à 7,25 g., I.C. reste égal à 130, le rapport s'abaisse de 6.8 à 5.7.

Nous trouvons cette même fixité de I.C., également dans tous les essais du tableau N° 10 : par exemple, entre la 7^{ème} et la 11^{ème} heure, dans la culture témoin, le glucose s'abaisse de 7.25 g. à 6.44 g. I.C. restant égal à 125.

En présence de l'association S + P_I, entre la 11^{ème} et la 24^{ème} heure, le glucose s'abaisse de 8,46 g. à 6,04 g., I.C. restant égal à 125.

Donc là aussi, il n'y a pas une perturbation spéciale du métabolisme glucidique que l'on pourrait rapporter à la présence d'antibiotiques seuls ou associés.

G. a diminué, et en même temps I.C. augmente. - Le cas est rare. il s'agit d'une aggravation encore plus prononcée de la dissociation glucose-I.C., que celle rapportée ci-avant; évidemment lorsque le numérateur d'une fraction diminue quand le dénominateur augmente, le rapport diminue nettement.

Lorsque I.C. augmente, c'est toujours pendant les premières heures de culture. Nous avons déjà signalé cette augmentation, lorsque nous avons cultivé E. COLI en présence de concentrations diverses de sulfamide.

Ici les augmentations notées sont de faible envergure. Exemple (Tableau N° 9) :

Dans la culture témoin, au départ il y a 9.26 g. de glucose et I.C. = 125. Au bout de 3 H., il reste 6.85 g. de glucose et I.C. est égal à 130, le rapport est passé de 7.4 à 5.3.

En présence de 0.02 p.100 de sulfamide, le glucose est passé de 8.86 g. à 8.46 g. et I.C. de 125 à 130, le rapport descend de 7.0 à 6.05.

En présence de l'association sulfamide-phénol (S+P₄) le glucose passe de 8.86 g. à 6.44 g. I.C. de 140 à 150 et le rapport de 6.3 à 4.3.

Nous remarquerons, ici, qu'en présence de phénol seul, I.C. n'augmente jamais. Nous ne pouvons que souligner ce fait, sans lui donner d'explication.

b) LE RAPPORT G/I.C. S'ELEVE.

L'élévation du rapport G/I.C est moins fréquente que sa diminution.

Dans quelques cas, il y a augmentation relative du glucose accompagnée d'un abaissement d'I.C. Il s'agit évidemment d'une augmentation apparente. Il est possible qu'une partie du glucose consommée au début de la croissance soit resynthétisée, mais il nous paraît plus probable que se soient formés des aldoses (aldéhyde glycérique ?) que le dosage chimique utilisé nous a fait compter pour du glucose.

Dans le tableau N° 9, dans la culture témoin, entre la 10^{ème} et la 50^{ème} heure, le glucose passe de 4.43 à 7.65 g. et I.C. de 110 à 95, le rapport de 4 à 8.

Le même phénomène s'observe dans les autres essais, mais son amplitude et sa durée sont variables comme le montrent les chiffres inscrits dans ce tableau.

Le plus souvent, il y a baisse d'I.C. non accompagnée d'une augmentation du glucose.

Nous avons observé (Tableau N°8), en présence de sulfamide, ou de phénol, ou de leur association, les modifications suivantes pendant les trois premières heures : le glucose reste constant 8.86 g., I.C. passant de 125 à 115, en présence de sulfamide 0.02 p.100 de 150 à 135, en présence de 0.004 p. 100 de phénol (P₃), comme en présence de l'association de ces deux agents; les

rapports G/I.C. passent respectivement de 7.0 à 7.7 pour le cas du sulfamide et de 5.9 à 6.6 pour le cas du phénol ou pour l'association.

c) LE RAPPORT G.I.C. NE CHANGE PAS.-

C'est le cas de cultures microbiennes où le métabolisme glucidique semble stoppé, G. et I.C. restent fixes : exemple : la culture témoin du tableau N° II à partir de la 24 ème heure.

Les cultures en présence de sulfamide ou de phénol, entre la 3 ème et la 6 ème heure (Tableaux N° 3 et II) présentent fréquemment cette fixité temporaire de G. et I.C., alors qu'il y a toujours une modification dans les trois premières heures.

Parfois il y a un changement dans l'un ou l'autre membre de la fraction $\frac{G}{I.C.}$, mais ce changement est trop faible pour influencer notablement la valeur du rapport.

Conclusions.-

Le métabolisme glucidique d'E. COLI évalué par la variation du taux de glucose et de I.C. au cours de la culture microbienne n'a pu nous révéler de perturbations provoquées par la présence de sulfamide, de phénol ou de leur association. Les différentes observations que nous avons faites et les exemples numériques donnés dans les quatre séries d'expériences montrent que l'étude du pouvoir réducteur du milieu de culture ne permet pas de caractériser un mode d'action des antibiotiques en expérience .

C)- RECHERCHE ET DOSAGE DE CERTAINS PRODUITS DE DEGRADATION DU GLUCOSE.-

Pour éclairer l'interprétation des résultats rapportés précédemment, nous avons étudié systématiquement les variations de la teneur du milieu en produits de décomposition du glucose, nous avons été ainsi amené à doser :

- l'alcool
- pH
- l'acidité totale
- l'acidité volatile
- l'acide lactique
- l'acide pyruvique
- les gaz dégagés

et à rapporter les résultats à la quantité de glucose consommé.

I) - Dosage de l'alcool.-

Ce dosage offre quelques difficultés en raison de la présence de nombreux corps réducteurs et volatils dans le milieu de

culture. Pour l'effectuer nous nous sommes adressé à la méthode de FRIEDEMANN et KLASS (43) qui nous a permis de retrouver avec une bonne approximation (1,2 p. 100) l'alcool incorporé dans des mélanges artificiels.

Voici la technique employée : nous avons dilué 25 cm³ de milieu avec 75 cm³ d'eau distillée et avons ajouté 10 cm³ d'une solution de sulfate mercurique (obtenue par dissolution de 100 g. de sulfate mercurique dans 1 litre de SO₄ H₂ 2N) et 15 cm³ d'une solution de tungstate de sodium à 10 p. 100.

Ce mélange est distillé. Nous avons recueilli 100 cm³ de distillat. 95 cm³ de ce distillat sont additionnés de 5 cm³ de la solution de sulfate mercurique précédente et d'une quantité d'un lait de chaux à 20 p. 100 suffisante pour faire apparaître une coloration orangée; nous ajoutons 35 cm³ d'eau distillée, agitions violemment et procédons à une seconde distillation. Cette opération a pour but de retenir les produits aldéhydiques ou cétoniques qui risqueraient d'interférer dans la suite du dosage. La distillation est poussée jusqu'à obtention de 100 cm³ de distillat.

Sur 5 cm³ de ce liquide sera pratiqué une oxydation nitro-chromique.

FRIEDMANN et KLASS recommandent de caractériser avec certitude le constituant oxydable du second distillat : ils font une oxydation chromique dans des conditions déterminées, distillent et caractérisent l'acide acétique formé par son coefficient de partage entre l'ether et l'eau.

Nous avons déterminé ce coefficient de partage d'une part sur une solution d'alcool pur après oxydation sulfochromique et d'autre part sur un second distillat provenant d'une culture d'E. COLI en milieu synthétique. Nous avons obtenu dans le premier cas un coefficient de partage de 87.8 p. 100 et dans le second cas un coefficient de 88.8 p. 100, donc très voisins. Mais n'ayant pas procédé systématiquement à cette caractérisation nous ne pouvons assurer rigoureusement que c'est bien de l'éthanol pur qui a été déterminé par chromométrie dans chaque essai; par prudence nous exprimons nos résultats non en éthanol mais en cm³ de solution de bichromate 0,01 N consommés pour oxyder 5 cm³ de milieu dans les conditions indiquées ci-dessus.

Nous avons d'abord voulu nous rendre compte dans quelle mesure la quantité d'alcool formée variait suivant les conditions expérimentales et nous avons réalisé des expériences en anaérobiose relative dont le protocole sera indiqué page 71 au sujet de l'analyse des gaz.

Les résultats consignés aux différentes heures se rapportent non pas à une même culture dont on ferait un prélèvement à des temps variables, mais à autant de cultures qu'il y eut de prélèvements, ceci pour respecter les conditions de l'anaérobiose que nous nous étions imposées.

pour une même quantité de glucose décomposée, il y a eu plus d'alcool formé en anaérobiose, qu'en aérobiose (au bout de 24 heures de culture), et cet alcool apparaît plus tôt : à la 6^{ème} heure, il n'y a pas d'alcool formé en aérobiose, malgré la consommation de glucose, tandis qu'une quantité importante d'alcool apparaît en anaérobiose malgré une consommation plus faible de glucose.

Dans le tableau N° I3 figurent les résultats obtenus dans des essais en anaérobiose en présence d'antibiotique faits concurremment avec la culture témoin dont nous venons de parler.

Dans cette expérience, à la 12^{ème} heure, la culture commençait à se développer en présence du sulfamide, mais non en présence de phénol, ni de l'association S + P. A la 24^{ème} heure, le développement était notable en présence de phénol. A la 48^{ème} heure, il débutait seulement en présence de l'association S + P.

En présence de sulfamide et de son association avec le phénol, l'apparition d'alcool est aussi précoce que dans la culture témoin, mais elle est beaucoup plus faible par rapport à la quantité de glucose consommée dans le même temps. Durant la bactériostase provoquée par le phénol, il semble y avoir un retard dans cette décomposition du glucose.

Dès que le développement bactérien devient important, la consommation du glucose augmente et également la production d'alcool. En présence de l'association où la bactériostase se maintient près de 48 heures, il y a aussi consommation de glucose, mais beaucoup moins importante et surtout la quantité d'alcool formé reste faible.

Donc, plus que la consommation de glucose, qui est variable et se produit même en absence de prolifération microbienne décelable, la formation d'alcool semble suivre cette prolifération, comme le prouve également l'expérience relatée dans le tableau N° I4.

Dans cette expérience, l'addition d'antibiotiques n'a pas provoqué la bactériostase attendue en raison d'un accident opératoire, la température où les cultures étaient placées étant montée à 39°. Dans ces conditions, il y eut développement bactérien en présence de sulfamide et de phénol, dans les 9 premières heures, comme dans la culture témoin, et au bout de 24 heures il y eut également un développement notable en présence de l'association S + P.

Or, on voit, dans ce tableau N° I4 qu'après 12 heures de culture le témoin présente une avance importante sur les autres essais, mais dès la 24^{ème} heure tous les résultats obtenus, quant à la production d'alcool, sont pratiquement identiques.

Culture témoin

Temps en heures	en aérobiose	en anaérobiose
3 { Bichromate } gluc. cons.	0 2.96	0 0
6 { Bichromate } Gluc. cons.	0 9.57	5.20 5.65
24 { Bichromate } gluc. cons.	15.60 17.73	18.80 17.70
48 { Bichromate } Gluc. cons.	16.40 21.76	
72 { Bichromate } gluc. cons.	21.60 21.76	

Tableau N° 12
Essais en Anaérobiose

Temps en heures	S	P	S + P
3 { Bichromate } Gluc. cons.	0 0	0 0	0 0
6 { bichromate } gluc. cons.	1.60 5.62	0 0	2.80 4.03
12 { bichromate } gluc. cons.	1.60 7.25	1.20 -	2.00 4.03
24 { bichromate } gluc. cons.	17.60 9.65	13.60 16	1.20 4.05
48 { bichromate } gluc. cons.	22.80 21.75	16.40 20.16	1.60 8.06

Tableau N° 13

Temps en heures	T	S	P	S + P
12 (bichromate)gluc. cons.	18.00 20.15	3.60 5.65	10.40 9.70	4.05
24 (bichromate)gluc. cons.	23.20 19.35	23.20 19.35	23.60 12.90	23.80 16.95
48 (bichromate)gluc. cons.	23.80 22.95	21.40 23.50	21.72 13.00	20.00 23.50

Tableau N° 14

Les Tableaux Nos 12, 13, 14, expriment pour 5 cm³ de milieu, les quantités d' "alcool" formé (en cm³ de solution de Bichromate de potassium 0,01 N) et les quantités de glucose consommées (en mg) au bout de temps variables, T représente la culture témoin; S une concentration en sulfamide de 0.01 p. 100, P une concentration en phénol de 0.04 p. 100, et S + P l'association des deux antibiotiques.

2) Variation du pH.

Dans nos expériences, la variation du pH a toujours été faible, le milieu étant bien tamponné. Voici comme exemple la variation observée dans deux séries de ballons ensemencés avec E. COLI et contenant soit du milieu seul (T) soit du milieu additionné de sulfanilamide à des concentrations de 0.2 - 0.1 - 0.02 - 0.01 p. 100.

Expérience N° 1						Expérience N° 2				
Temps en Heures	T	I	II	III	IV	T	I	II	III	IV
0 (opacité) pH	25 7.0	25 7.1	25 7.1	25 7.0	25 7.0	26 7.0	26 7.1	26 7.1	26 7.0	26 7.0
3 (opac.)pH	28 7.0	28 7.1	28 7.1	28 7.0	28 7.1	26 7.0	28 7.1	28 7.1	28 7.0	26 7.0
6 (opac.)pH	50 6.8	28 7.1	28 7.1	28 6.9	30 7.0	35 6.8	36 7.1	28 7.1	28 6.9	30 6.9
9 (opac.)pH	95 6.9	29 7.1	29 7.0	32 6.9	32 6.9	70 6.8	40 7.1	28 7.0	28 6.9	32 6.9
13½ (opac.)pH	95 6.7	32 7.1	29 7.0	32 6.9	35 6.9	155 6.7	45 7.0	32 7.0	33 6.9	60 6.8
25 (opac.) pH	95 6.7	32 7.0	30 7.0	34 6.9	85 6.8	160 6.7	60 7.0	32 7.0	33 6.9	60 6.8
52 (opac.)pH	110 6.0	68 6.3	52 6.5	102 6.3	120 6.9	160 6.1	138 6.3	75 6.5	115 6.1	145 6.1
106 (opac.)pH	112 5.1	115 5.1	145 5.1	117 5.1	140 5.1	167 5.2	270 5.1	240 5.1	152 5.1	150 5.1

Les résultats de ce tableau se rapportent à :

Culture de E. COLI sur milieu pur (T) ou additionné de sulfanilamide à diverses concentrations : 0.2 p. 100 (I);
0,1 p. 100 (II);
0.02 p. 100 (III);
0.01 p. 100 (IV).

Au moment de l'ensemencement, le pH est égal à 7 ou 7,1 puis il s'abaisse sous l'influence du développement microbien : nous le voyons passer de 7 à 6,8 dès la 6^{ème} heure chez les deux témoins et continuer à baisser. Dans les cultures en présence de sulfamide, aussi longtemps que se prolonge le temps de latence, il n'y a pas de variation de pH puis le pH s'abaisse mais il n'y a pas exacte proportionnalité entre l'intensité de développement et cet abaissement.

A la 52^{ème} heure par exemple, l'opacité I10 est réalisée dans un tube à pH 6,0 et l'opacité I20 qui est très voisine est réalisée dans un tube à pH 6.0. Inversement, à la 25^{ème} heure, nous avons noté, pour des pH voisins (6.7 et 6.9) des opacités aussi différentes que I60 et 33. Cependant à la 106^{ème} heure, toutes les cultures arrivent à présenter un pH voisin de 5 bien que la multiplication n'y ait pourtant pas été d'une égale intensité. Comme nous l'avons vu lors de l'étude de la consommation du glucose par E. COLI, le pH minimum correspond à la consommation maxima du glucose dans les conditions réalisées.

On ne peut donc attribuer au pH une valeur quantitative pour l'évaluation de la multiplication microbienne, pour la mesure exacte de l'activité d'antibiotique. La production d'ion H^+ par E. COLI est du même ordre en présence ou en l'absence de sulfamides. Le sulfamide retardant le développement microbien, retarde l'acidification réelle du milieu.

3) Dosage de l'acidité totale.-

IVANOVICS, en 1943 (55) avait déjà eu la pensée d'étudier les modifications apportées par les antibiotiques à l'acidification du milieu de culture. Plus récemment SARTORY et MEYER (101) ont comparé différents milieux de culture en dosant l'acidité que le développement de E. COLI y produisait.

Pour doser l'acidité de nos milieux de culture, nous avons prélevé 25 cm³ dans le cas d'un seul prélèvement, et 5 cm³ dans le cas de plusieurs prélèvements, et déterminé l'acidité avec NaOH 0,1 N en présence de phénol-phtaléine. Pour déterminer l'influence que le CO₂ formé par E. COLI peut avoir sur le dosage d'acidité effectué en présence de phtaléine, nous avons soumis quelques prélèvements à l'ébullition. Après départ de CO₂, l'acidité n'a baissé que de 10 p. 100 environ, passant par exemple de 12.9 cm³ de NaOH à 11.7.

Dans le tableau suivant, (Tableau N° 16) on trouvera des mesures d'acidité exprimées en cm³ de NaOH 0.1 N nécessaires à neutraliser 25 cm³ de milieu, en présence de phénolphtaléine à froid.

T y désigne la culture témoin (milieu pur), S le milieu contenant 0,01 p. 100 de sulfanilamide, P le milieu contenant 0,066 p. 100 de phénol et S + P l'association de ces deux agents à ces concentrations.

Temps :	3 H.	6 H.	12 H.	24 H.	48 H.
T	2.7	3.3	-	10.8	11.8
S	3.3	3.3	3.3	10.6	14
P	1.3	1.5	1.5	7	7.3
S + P	1.3	2	2	1.5	1.7

Tableau N° 16

Ce tableau montre que si l'acidité reste faible dans tous les essais au cours des premières heures de culture, il en est tout autrement au bout de 24 et 48 Heures de culture. L'aspect des fioles en expérience laisse à penser que l'acidité qui se développe est en rapport avec la multiplication microbienne. D'ailleurs si on emploie des doses de sulfamide et de phénol assez faibles pour qu'il n'y ait pas d'inhibition marquée du développement microbien, l'acidité est trouvée, à tous les examens, pratiquement identique dans tous les essais.

Dans l'expérience suivante, (Tableau N° 17), l'acidité a été dosée avant et après ébullition de 3 minutes, de façon à obtenir une fraction de cette acidité, celle qui est volatile dans ces conditions expérimentales.

	culture de 12 H.				culture de 48 h.			
	T	S	P	PS	T	S	P	PS
Intensité du développement	++	+	+-	-	+++	+++	+++	+
acidité avant ébullition	11.7	2.5	7.3	1.5	12.7	12.9	14	9
acidité après ébullition	10.3	2.5	6.5	1.5	10.8	10.9	11	8
acid. volatile p. 100	12	0	11	0	15	16	21	11

Tableau N° 17

La proportion d'acide volatils (chassés par ébullition) augmente en même temps que l'acidité totale.

Nous avons mis en expérience plusieurs cultures dans lesquelles étaient notées, l'opacité, l'acidité et la quantité de glucose consommée. Nous pouvions ainsi suivre l'augmentation de l'acidité en même temps que la multiplication microbienne et nous connaissions la quantité de glucose qui avait fourni cette acidité.

Une correction constante a dû être pratiquée sur les résultats des dosages d'acidité, la quantité de soude nécessaire pour faire passer le milieu de culture de son pH initial, (7.0 à 7.2) au pH de virage au rose de la phénolphtaléine (9) n'est pas négligeable, le milieu étant tamponné. Nous employions en général 1,3 cm³ de Na OH 0.1 N pour obtenir le virage dans 10 cm³ de milieu additionné de deux gouttes de phénolphtaléine.

Voici les résultats de deux de ces expériences faites la première en tubes et la seconde en ballons. La densité optique a été mesurée au spectrophotomètre de Coleman et multipliée par 100 (Tableaux N° 18 & 19)

On constate que l'acidité totale augmente au moment où la multiplication microbienne est rapide. Elle n'atteint jamais une valeur élevée et se stabilise autour de 0.05 N - 0.04 N.

Nous avons remarqué plus haut, la fixité du pH au bout d'une centaine d'heures à une valeur identique pour tous les essais, en absence ou en présence d'antibiotiques, alors que la croissance microbienne était différente. Ici aussi les valeurs de l'acidité se rapprochent les unes des autres. On remarquera en particulier les valeurs de cette acidité très voisines dans tous les essais après 24 heures de culture (Tableau N°18) et après 32 Heures (Tableau N° 19), malgré un développement microbien plus faible en présence de l'association S + P. Dans l'expérience relatée au tableau N° 16, au contraire, l'acidité restait très faible dans l'essai S + P.

Quant à la relation pouvant exister entre la quantité de glucose consommée et la quantité d'acides apparus, on peut dire que l'augmentation d'acidité suit à peu près la disparition du glucose, mais les chiffres cités au tableau N° 18 à la 10^{ème} et la 24^{ème} heures montrent qu'il peut se présenter certains écarts à cette règle.

Temps en heures	T	S	P	S + P
3 { D. OPT. Acidité Gluc. Cons.	14 0.76 --	14 0.74 -	14 0.75 -	14 0.75 -
7 { D. Opt. Acidité Gluc. Cons.	27 1.40 5.1	14 0.93 2.8	17 1.16 5.4	14 0.94 -
10 { D. Opt. Acidité Gluc. Cons.	42 2.04 14.3	25 1.24 12.6	26 1.26 6.5	20 1.04 12.3
24 { D. Opt. Acidité Gluc. Cons.	43 2.4 16	30 2.36 15.1	40 2.44 12.6	18 2.36 14

Tableau N° 19

Comparaison entre le développement bactérien (D.opt.), l'acidité (exprimée en cm³ de NaOH 0,1 N), et la consommation de glucose (exprimée en mg), dans 5 cm³ de milieu.

E.COLI est cultivé en tubes à essais dans 10 cm³ de milieu pur (T) additionné de sulfanilamide à 0.01 p. 100 (S) de phénol à 0.04 p. 100 (P), et de leur association (S + P).

Temps en heures	T	S	P	S+P
3 { D. Opt. Acidité Gluc. Cons.	11.5 0.62	11 0.60	11 0.62	12 0.60
8 { D. Opt. Acidité Gluc. Cons.	23 1.54 9.6	13 0.74 2	18 1.28 7.6	13 0.72 0.2
11 { D. Opt. Acidité Gluc. Cons.	25 1.92	14 0.92	26 1.88	15 0.86
26 { D. Opt. Acidité Gluc. Cons.	30.5 2.28 10.6	21.5 2.20 9.3	27.5 2.44 11.9	19.5 2 11.2
32 { D. opt. Acidité Gluc. Cons.	32 2.10 10.6	22 2.12 11.7	28 2.4 13.6	20 2.08 11.2

Tableau N° 19

même expérience que dans le Tableau N°18, mais la culture a été faite en ballons, dans 200 cm³ de milieu.

4 - Dosage de l'acidité volatile.

Lors de la décomposition du glucose sous l'influence de E.COLI Il y a production d'acides volatils dans le milieu de culture. La teneur du milieu en acides volatils pourra-t-elle nous donner une indication sur les modalités de l'action du sulfamide, du phénol et de leur association ? C'est ce que nous allons étudier.

La technique employée est celle de FRIEDBMANN (41).

25 cm³ de milieu sont acidifiés par 4 cm³ d'acide sulfurique 10 N (acide sensiblement au 1/2) et additionnés de 15 cm³ d'une solution de tungstate de sodium à 10 p. 100 et de 8 g. de sulfate de magnésium cristallisé. On chauffe d'abord à feu nu, doucement, pour réduire le volume à 30 cm³ et l'on fait alors un entraînement à la vapeur d'eau, en maintenant le volume à 30 cm³ environ. On arrête l'opération lorsqu'on a entraîné environ 200 cm³ de liquide. Ce liquide est alors additionné de 2 cm³ d'acide sulfurique 10 N, de 50 g. de sulfate de magnésium cristallisé et de 0,25 g. environ d'oxyde rouge de mercure. Une distillation est pratiquée jusqu'au début de cristallisation du sel dans le ballon. L'acidité est dosée par la méthode, en présence de phénolphthaléine après passage d'un courant d'air (privé au préalable de CO₂) dont le but est de chasser CO₂ dissous dans le distillat.

L'auteur prescrit aussi une détermination du coefficient de partage entre l'éther et l'eau du ou des acides afin de les identifier.

Lors de l'entraînement des acides par la vapeur d'eau bouillante, il y a passage dans le distillat d'acides lactique, pyruvique formique. La redistillation dans les conditions indiquées permet d'éliminer ces causes d'erreur. Le rôle de SO₄ Mg au cours de l'entraînement et de la distillation est d'augmenter la volatilité des acides.

Nous avons pratiqué le dosage des acides volatils de la manière indiquée. La titration finale est faite avec NaOH 0,02 N en présence de phénolphthaléine.

Les résultats obtenus sont exprimés en cm³ de Na OH 0,1 N pour 5 cm³ de milieu, ce qui facilite leur comparaison avec les chiffres fournis dans les dosages d'acidité totale.

Les dosages ont été effectués simultanément aux dosages d'alcool (v. page 58); leurs résultats sont rapportés dans les tableaux N° 20, 21.

Nous remarquons la non proportionnalité entre l'acidité volatile et l'acidité totale, d'une part, et entre l'acidité volatile et le glucose consommé d'autre part. La bactériostase empêche ou ralentit la formation d'acides volatils, bien qu'il y ait consommation importante de glucose; au contraire dans la culture témoin les acides volatils se forment avant même que le développement bactérien soit devenu conséquent.

Dans le tableau N° 2I, qui correspond comme nous l'avons dit plus haut à une expérience où il n'y eut pas de bactériostase notable nous voyons au contraire les chiffres correspondants à l'acidité totale et à l'acidité volatile atteindre des valeurs voisines, dès la 24^{ème} heure dans tous les essais (la multiplication microbienne s'est faite dans tous les essais). A la 12^{ème} heure, au contraire, les valeurs sont plus basses en présence de sulfamide et de l'association sulfamide-phénol que dans le milieu seul ou additionné de phénol : nous avons déjà dit qu'à ce moment, il y avait encore bactériostase dans le cas de l'association S + P; quant à la culture additionnée de sulfamide, son développement était certainement moins important qu'en présence de phénol, comme le témoigne l'ensemble des chiffres obtenus dans ces deux essais.

De ces observations, on peut conclure que si l'acidité volatile peut donner une indication sur la valeur du développement microbien, elle n'apporte en cela pas d'éléments nouveaux, car cette indication se superpose simplement aux renseignements fournis par le dosage de l'acidité totale.

Temps en heures	témoin en aérobiose	témoin en anaérobiose	en anaérobiose		
			S	P	S+P
(Ac. Totale	0.41	0			
) Ac. Volatile					
) Gluc. cons.	2.96	0			
) Ac. Totale	0.54		0.30	0.20	0.70
(Ac. volatile	-	0.24	0.06	0	0.02
) Gluc. cons.	9.67	5.65	5.62	0	4.03
2) Ac. Totale	-	-	0.30	0.20	0
(Ac. Volatile	-	-	0.02	-	0
) Gluc. cons.	-	-	7.25	-	4.03
) Ac. totale	1.79	1.40	1.52	1.14	0.20
24(Ac. volatile	1.30	0.90	0.74	0.65	-
) Gluc. cons.	17.73	17.70	9.65	16.00	4.05
) Ac. totale	1.94		2.20	1.20	0.40
48(ac. volatile	0.94		0.62	0.88	-
) Gluc. cons.	21.76		21.75	20.16	8.05

Tableau N° 20

Temps en heures		Témoin	S	P	S + P
12	{ Ac. totale				
	{ avant ébull.	2.08	0.24	1.20	0.04
	{ après "	1.80	0.24	1.04	0.04
	{ ac. volatile	1.12	0.17	0.76	0
	{ Gluc. cons.	20.15	5.65	9.70	4.05
25	{ ac. totale				
	{ avant ébull.	2.32	2.28	2.28	2.22
	{ après "	2.08	2.02	2.10	1.98
	{ Ac. volatile	0.88	0.89	0.84	1.09
	{ Gluc. cons.	19.35	19.35	12.90	16.95
48	{ Ac. totale				
	{ avant ébull.	2.28	2.32	2.54	1.54
	{ après "	1.90	1.92	1.94	1.32
	{ ac. volatile	1.28	1.06	1.00	0.80
	{ Gluc. cons.	22.95	23.50	13.00	23.50

Tableau N° 2I

Variations de l'Acidité et du glucose consommé en fonction du temps dans des cultures d'E. COLI sur milieu pur (T) ou additionné de sulfanilamide (0.01 p. 100) (S), de phénol (0.04 p. 100) (P) ou de leur association. Les acidités sont exprimés en cm³ de Na OH 0,1 N et le glucose en mg, pour 5 cm³ de milieu.

5 - Dosage de l'acide lactique.-

Nous avons rappelé (page 17) le schéma de décomposition du glucose par E. COLI, or ce schéma montre la formation d'acide lactique aux dépens du glucose.

Nous avons donc dosé comparativement la quantité de glucose consommé et la quantité d'acide lactique apparu dans des cultures d'E. COLI en milieu synthétique seul et en présence de sulfamide, de phénol et de leur association.

Technique.- Le choix de notre technique nous a été imposé par les conditions dans lesquelles se déroulaient nos essais. La nécessité de faire de nombreux dosages simultanément et à des moments relativement rapprochés nous a conduit à ne pas employer l'excellente méthode par oxydation et distillation de FRIEDEMANN et GRAESER (42), et à faire appel à la colorimétrie. Nous avons utilisé quelquefois la méthode au vératrol de MENDEL et GOLDSCHIEDER (87) mais en général la méthode à la codéine en adoptant la technique de SERVANTIE (103) : 1 cm³ d'une solution étalon d'acide

lactique à 0.01 g. p. 100 est additionné de 5 cm³ d'acide sulfurique pur (exempt de nitrites); le tout est porté pendant 2 minutes au bain-marie bouillant; on refroidit, on ajoute 0,1 cm³ d'une solution de codéine à 5 p. 100; on mélange et on effectue la colorimétrie au bout de 7 à 8 minutes.

Nous avons vérifié que la proportionnalité est gardée pour les concentrations inférieures ou égales à 0,1 % (en opérant sur 1 cc) comme l'avait indiqué SERVANTIE; la couleur de la solution obtenue étant d'un jaune franc, et la coloration lisible après 10 minutes est stable au moins 30 Minutes. Au contraire, pour des concentrations supérieures, la coloration qui est alors jaune orangé varie avec le temps et paraît se développer d'autant plus lentement que la teneur en acide lactique est plus élevée.

Pour doser l'acide lactique dans nos milieux de culture, nous devons au préalable en éliminer le glucose. Nous avons fait cette élimination par le procédé classique au sulfate de cuivre et à la chaux : 5 cm³ de milieu sont additionnés de 5 cm³ de solution de 504 Cu à 20 p. 100 et de 5 cm³ d'un lait de chaux à 10 p. 100, On laisse en repos pendant 1/2 heure puis on centrifuge.

Le dosage d'acide lactique est fait sur 1 cc de cette dilution, représentant donc le tiers de son volume en milieu initial.

A chaque essai, nous préparions un ou deux tubes témoins contenant une quantité connue d'acide lactique, afin de nous assurer de la fidélité de la réaction, et au lieu de comparer les tubes entre eux, nous avons fait des lectures au spectrocolorimètre de Coleman avec une longueur d'onde de 470 millimicrons.

Dans les milieux où le phénol apportait une légère coloration jaune, celle-ci était déduite de la coloration finale obtenue.

Les résultats de nos dosages seront exposés en même temps que ceux ayant trait à l'acide pyruvique (page 69 et suivantes)

6 - Dosage de l'acide pyruvique.

Nous avons indiqué que E. COLI était également susceptible de former de l'acide pyruvique. Il peut aussi oxyder cet acide (72). Nous avons pensé que comme pour tout autre produit de décomposition du glucose, le dosage de l'acide pyruvique pouvait nous révéler une perturbation du métabolisme bactérien en présence de sulfamide, de phénol ou de leur association.

Technique. - Nous n'avons pu essayer la méthode spécifique à la dinitrophénylhydrazine qui a été tout spécialement utilisée dans les milieux de culture (74), n'ayant pu nous procurer ce réactif à l'époque où nous effectuions nos expériences (1947-1948). La méthode iodométrique mise au point par HAAG et DALPHIN (48) pour doser l'acide pyruvique dans les cultures microbiennes à l'inconvénient d'être influencée par le glucose et donc de nécessiter des corrections empiriques.

Le dosage colorimétrique a retenu notre attention : SIMON (III) a montré que l'acide pyruvique donne avec le nitroprussiate de sodium et l'ammoniaque une coloration qui va du vert au bleu suivant la concentration. La réaction a été ultérieurement sensibilisée par addition de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ (I8).

Voici la technique indiquée par CARON et RAQUET :

10 cm³ de solution d'acide pyruvique (de titre inférieur à 0.05 p. 100) sont additionnés de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ jusqu'à saturation, soit 7 à 8 g., puis additionnés de II à V gouttes (suivant la concentration en acide pyruvique) d'une solution récente de nitroprussiate de Na au 1/10 et de 1 cm³ de $\text{NH}_4 \text{OH}$ officinale.

Des solutions à 0.02 p. 100 donnent encore presque immédiatement une belle coloration bleue, celles à 0.002 p. 100 donnent une coloration verdâtre au bout de 30 minutes.

Nous avons préparé des gammes de solution d'acide pyruvique et appliqué la méthode précédente. La sensibilité de la méthode est telle que nous avons pu apprécier la concentration 0.001 p. 100 en acide pyruvique.

Pour chaque série de dosages nous réalisons la réaction d'une part sur des solutions pures de titre connu en acide pyruvique et d'autre part, sur nos milieux de culture, débarrassés des germes par centrifugation. La comparaison au colorimètre est faite au bout d'1/2 heure.

Résultats des dosages d'acide lactique et d'acide pyruvique.

Une première série d'expérience nous a montré que l'apparition d'acide lactique et d'acide pyruvique en quantité notable dans les milieux était en rapport avec le développement microbien : en milieu pur, alors qu'à la 6^{ème} heure on ne note que des quantités à peine décelables de ces deux acides, à la 10^{ème} heure on peut doser 0,09 g. d'acide lactique et 0,03 g. d'acide pyruvique par litre de milieu. Au contraire, en présence de sulfanilamide, de phénol ou de leur association, 10 heures après l'ensemencement, alors que le développement bactérien ne s'est pas encore manifesté, les teneurs en acides lactique et pyruvique sont indosables.

Une deuxième série d'expériences, pratiquée en anaérobiose en fioles d'Erlenmeyer confirme que les acides lactique et pyruvique ne se forment en quantité appréciable que lorsque le développement microbien devient intense et que la consommation du glucose est importante. (Tableau N° 22)

Une troisième et quatrième séries d'expériences pratiquées en aérobiose en tubes à essais ont été examinées à partir de la 24 ème heure de culture (Tableau N° 23). Nous y remarquons une quantité beaucoup plus élevée d'acide lactique que dans les essais précédents, qui étaient interrompus, il est vrai, à la 24 ème heure.

Une cinquième série d'expériences a été faite en aérobiose et elle montre encore que l'acide lactique ne prend des valeurs notables que lorsque le développement microbien est devenu appréciable et que la quantité de glucose consommée dépasse 1.30 g. p. 1000. Dans cette expérience, comme dans les précédentes, l'addition de sulfamide, de phénol ou du mélange de ces deux corps retarde le développement microbien, mais lorsque celui-ci a lieu il ne semble pas présenter de caractéristiques nettes quant à la consommation du glucose et à sa transformation en acide lactique.

Temps en heures	T	S	P	S + P
3 { dens. lact. (Pyr. gluc. cons.	- ≤ 0.06 ≤ 0.01 0	- ≤ 0.06 ≤ 0.01 0	- ≤ 0.06 ≤ 0.01 0	- ≤ 0.06 ≤ 0.01 0
6 { dens. Lact. (Pyr. Gluc. Cons.	+ 0.06 traces 0.32	- ≤ 0.06 ≤ 0.01 0	- ≤ 0.06 ≤ 0.01 0	- ≤ 0.06 ≤ 0.01 0
12 { dens. lact. pyr. (glucW cons.	++ 0.21 0.08 0.84	+ ≤ 0.06 ≤ 0.01 1.61	+ ≤ 0.06 traces 4.03	- ≤ 0.06 ≤ 0.01 0
24 { dens. Lact. pyr. (gluc. cons.	+++ 0.48 0.04 4.43	+ 0.09 0.02 2.82	++ 0.60 0.08 3.63	+ 0.09 0.02 2.02

Tableau N° 22

formation d'acide lactique, d'acide pyruvique et disparition du glucose (exprimés en g. par litre) en anaérobiose dans des cultures d'E. COLI en milieu pur (T) ou additionné de sulfanilamide à la concentration de 0.01 p. 100 (S) de phénol à la concentration de 0.04 p. 100 (P) ou de leur association (S + P).

Temps en heures	T	S	P	T	S	P	S+P
24 { D. opt	28	16	18	29	9.5	16.5	8
{ Ac. lact.	2	-	1.5	2.45	0	1.3	0
{ Ac. pyr.	0.05	0.02	0.08	0.09	0	0.18	0.02
48 { D. Opt.	33	23	26	33	20	23	10
{ Ac. lact.	2.3	1.9	1.7	2.5	1.9	2.4	1.8
{ Ac. pyr.	0.05	0.06	0.08	0.12	0.10	0.14	0.04
72 { D. Opt.	36	28	29	34	27	24	14.5
{ Ac. Lact.	2.3	2.3	1.8	2.4	2.0	2.0	0.9
{ Ac pyr.	0.05	0.10	0.08	0.10	0.11	0.16	0.06

Tableau N° 23

Densité optique lue au spectrophotomètre de Coleman et quantités d'acide lactique et d'acide pyruvique formés dans des cultures en aérobiose de *E. COLI* en milieu seul (T) ou additionné de sulfanilamide S (0.01 p. 100) de phénol P (0.04 p. 100) ou de leur association S + P.

Nous constatons une augmentation progressive de l'acide lactique durant le développement microbien, aussi bien en présence qu'en absence d'antibiotiques, mais il n'y a pas proportionnalité avec la quantité de glucose consommée. Ce qui, d'ailleurs, ne doit pas surprendre, car comme nous l'avons dit (page 17) le métabolisme du glucose n'est pas le même durant tout le développement bactérien.

Quant à la très faible valeur d'acide lactique trouvée (elle représente en général 1/10 à 1/30 du poids de glucose consommé) si on la compare aux indications données par HARDEN, il faut sans doute l'attribuer non pas à l'aération plus ou moins relative ou nulle des cultures, mais aux conditions expérimentales (la nature du milieu en particulier), car STOKES (113) a montré la grande variabilité de l'acide lactique formé dans les cultures d'*E. COLI*.

D'ailleurs nos essais relatés Tableau N° 23, faits en tubes (et non en erlens) montrent des chiffres beaucoup plus élevés d'acide lactique comme le prouvent les examens à 24 heures de culture. Donc les conditions réalisées sont importantes.

L'acide pyruvique atteint de très faibles valeurs lors de la croissance microbienne. En 24 heures, il représente le 1/100 du glucose consommé (Tableau N° 22) sauf pour la culture en présence de phénol (1/50). Dans la culture témoin observée à 12 heures, il est égal aussi à 1/50 du glucose consommé. Mais ici, peut-être plus encore que dans le cas de l'acide lactique, il faudrait de très nombreuses expériences pour discerner les influences de l'âge

de la culture, et de la consommation plus ou moins importante de glucose. Nous avons, en effet, montré qu'un même germe consommait des quantités de glucose qui n'étaient pas identiques d'une expérience à l'autre.

Pouvons-nous toutefois comparer la décomposition de glucose en acide lactique et en acide pyruvique dans les cultures témoins et dans les cultures en présence de sulfamide et de phénol ?

Dans les deux expériences mentionnées tableau N° 22 (en anaérobiose, en fioles d'Erlenmeyer) et tableau N° 23 (en aérobiose, en tubes) figurent le développement microbien et les quantités d'acides apparues. La seule différence qu'il nous soit permis de signaler, étant donnée la pauvreté des références, est la quantité légèrement plus élevée d'acide pyruvique en présence de phénol seul ou associé (mais surtout seul) alors que la multiplication microbienne y est plus faible que dans les autres essais.

Nous signalons cette observation, car LENTI (72 a) a montré que le phénol inhibe l'oxydation de l'acide pyruvique par E. COLI. Et comme l'acide pyruvique aurait une action inhibitrice sur l'oxydation de l'acide acétique (72 b), on pourrait s'attendre à une accumulation d'acide acétique dans les cultures en présence de phénol. Nous avons, en fait, observé (Tableau N° 2I) que la quantité d'acides volatils représentait une fraction plus importante du glucose consommé en présence de phénol. Sans doute ne s'agit-il que d'une indication, qui mériterait d'être confirmée ou infirmée par un plus grand nombre d'essais.

7 - Etude des Gaz.

Les tentatives évidemment fragmentaires que nous avons faites pour cette étude nous ont profondément déçu par l'inconstance des résultats. Si nous en faisons état, c'est pour être complet dans l'énumération de nos essais sur le métabolisme d'E. COLI en présence d'antibiotiques.

Suivant le schéma habituel, ces essais ont été faits simultanément sur des cultures d' E. COLI en milieu pur (Témoin) ou additionné de sulfanilamide à 0.01 p. 100 (S) de phénol à 0.066 p. 100 (P) ou de leur association à ces mêmes concentrations.

Nous avons opéré en fioles d'Erlenmeyer totalement remplies et fermées avec un bouchon de liège que nous couvrons de collodion pour éviter toute entrée d'air. Le bouchon est troué de manière à laisser passage à un petit tube à dégagement qui se remplit de milieu lorsque le bouchon est enfoncé. Ce tube débouche dans une éprouvette graduée contenant du mercure et placée elle-même sur mercure.

Les erlens sont plongés dans un bain-marie électrique chauffé à 37°.

Nous avons observé des dégagements gazeux plus ou moins intenses et toujours assez tardifs. Le dégagement ne devient notable que lorsque la culture microbienne est déjà très bien développée, par exemple entre la 12 ème et la 24 ème heures pour le témoin

et entre la 24 ème et 36 ème heures pour le milieu au sulfanilamide.

Il ne semble pas que la présence d'antibiotiques modifie la nature du métabolisme qui conduit au dégagement de gaz : dès que la culture a terminé sa phase logarithmique de croissance, le dégagement gazeux devient notable (Tableau N° 24)

Les volumes gazeux notés lors de plusieurs essais présentent des variations si fortes que les différences qui existent entre le volume de gaz dégagé par le témoin et celui dégagé dans le milieu sulfamidé, par exemple, ne peuvent être prises en considération.

On voit dans le Tableau N° 24 qu'entre la 24 ème et la 36 ème heure, il y a chez le témoin un dégagement de 32 cm³, alors que dans une autre expérience 18 cm³ seulement étaient dégagés entre la 20 ème et la 40 ème heures.

	T	S	P	S+P
0 - 12 H; développement GAZ EN C'm ³	+++ 0.5	+ 0	++ 0	0 0
12 - 24 h. développement Gaz en cm ³	+++ 12.5	++ 0.5	+++ 5	++ 0
24 - 36 h. développement Gaz en cm ³	+++ 32	+++ 17	+++ 32	+++ 18.9

Tableau N° 24

La composition globale des gaz a été déterminée dans une culture d'E. COLI sur milieu synthétique pur. Voici les résultats de cette analyse :

après 20 heures de culture :	CO ₂	20.1	p.100
	H ₂	73.1	
	air	6.8	
Après 36 heures	"	CO ₂	30.1
		H ₂	63.4
		air	6.5
Après 48 heures	"	CO ₂	34.8
		H ₂	65

Aucun échantillon ne contenait de carbures d'hydrogène.

Nous nous sommes contenté, en gégéral, de déterminer la teneur en CO₂ des gaz produits par les cultures. Les éprouvettes étant transportées sur cuve à mercure, le volume gazeux total est noté, puis CO₂ est absorbé par une pastille de potasse. La différence des lectures faites avant et après action de l'alcali fournit la valeur en CO₂

Mais nous n'avons pas poursuivi nos essais d'analyse quantitative, car nous avons trouvé des valeurs si diverses qu'aucune déduction nous a paru possible. Ainsi certaines expériences nous ont montré une influence nette des antibiotiques sur le pourcentage de CO₂ existant dans les gaz dégagés :

entre 48 et 72 h. de culture, les pourcentages de CO₂ étaient respectivement :

T : 15 p. 100
S : 37,2 p. 100
P : 16.6 p. 100
SP : 9.3 P. 100

Tandis qu'une autre expérience semblait indiquer que les teneurs en CO₂ n'étaient pas modifiées par les antibiotiques :

entre 36 et 48 h. de culture, les pourcentages de CO₂ étaient respectivement :

T : 21.5 p. 100
S : 23.8 p. 100
SP : 22.5 p. 100

CONCLUSIONS

Nous avons été frappés par les effets favorables que l'association phénol-sulfamide apportait à la bactériostase que ce seul agent est susceptible d'engendrer. Nous nous sommes demandés si des variations du métabolisme étaient capables de rendre compte de ce phénomène et, peut-être, d'en donner une explication biochimique. Aussi nous sommes nous proposés dans ce travail d'étudier le pouvoir bactériostatique d'un sulfamide, le sulfanilamide, du phénol et de l'association synergique de ces deux agents, au point de vue des échanges métaboliques d'E. COLI. Nous nous sommes limités à l'étude de l'utilisation de la source azotée et de la source carbonée.

L'utilisation de la source azotée nous a peu retenu pour les deux raisons suivantes : d'une part, la consommation d'un sel ammoniacal est beaucoup trop faible pour se prêter à des dosages corrects, d'autre part un milieu synthétique contenant de l'urée comme source azotée a servi dans quelques essais seulement. L'expérience nous a montré que E. COLI peut présenter une même prolifération pour une consommation d'urée différente, et qu'en présence de sulfanilamide cette prolifération devient plus importante qu'en son absence.

L'étude de la diminution du glucose au cours de la culture, nous a fourni plusieurs résultats intéressants : la consommation de glucose par E. COLI commence avant que tout développement microbien soit appréciable par opacimétrie. Si on diminue beaucoup le développement d'E. COLI par une forte dose de sulfanilamide on n'empêche pas la consommation de glucose. Malgré le retard de multiplication provoqué par l'antibiotique, il y a parfois une consommation de glucose supérieure à celle d'une culture témoin bien développée.

La disparition de glucose non accompagnée d'une augmentation de matière vivante, correspond à la formation de produits intermédiaires. Nous avons mis en évidence des produits intermédiaires réducteurs par des déterminations d'indice chromique dans le milieu, à différentes heures de culture. Ces produits intermédiaires peuvent ensuite être utilisés par le microorganisme. Mais nous n'avons pu caractériser ainsi un mode d'action particulier aux antibiotiques seuls ou associés.

Nous avons ensuite étudié la dégradation du glucose, en dosant dans le milieu de culture : l'alcool, l'acidité totale et l'acidité volatile, l'acide lactique, l'acide pyruvique. Nous avons enfin essayé de suivre la production gazeuse au cours de cultures en milieu anaérobie et d'analyser ces gaz. Là encore, nous n'avons pu mettre en évidence de perturbations particulières dues à la présence d'antibiotiques.

En résumé, les variations observées dans les produits azotés ou carbonés contenus dans le milieu synthétique ensemencé avec E. COLI ne permettent pas d'éclaircir le mode d'action d'un sulfamide et d'un phénol, même lorsque ces deux agents sont associés.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- I ABDERHALDEN R. Fermentforsch. 1942 16 435
- 2 ALTMAN. K I. J. Biol. Chem. 1946 166 149
- 3 ANDERSON E. PILGRIM F. ELVEHJEM C.A. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1944 55 39
- 4 AUBEL E., GRUNBERG-MANAGO M., SZULMAJSTER J Bioch. et Biophysica Acta 1949 3 442
- 5 AUBEL E., SALABARTAN J C.R.Ac. Sc. 1925 180 1784
- 6 BARRON E.S.G., JACOBS H.R. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1937 37 10
- 7 BAUDOIN A., LEWIN J. Bull. Soc. Ch. Biol. 1927 9 280
- 8 BECK G. E. Schweig. Z. Path. Bakt. 1948 II 66
- 9 BENESCH R., BARRON N.S., MAWSON C.A. Nature 1944 153 138
- 10 BERNHEIM F. The Interaction of Drugs and Cell Catalysts, Minneapolis 1946
- 11 BLASS J. Ann. Inst. Past. 1947 73 885
- 12 BOIVIN A. Rev. Med. Liège 1948 3 237
- 13 BOIVIN A., TULASNE R., VENDRELY, R., MINCK R., Arch. Sc. Physiol. 1947 I 307
- 14 BRATTON A.C. WHITE H.J., MARSCHALL E.K. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1939 42 847
- 15 BROH-KAHN R.H. Science 1939 90 543
- 16 BRÜCKE F. KAINDL F. Wein Klin. Wochr. 1946 59 366
- 17 BURTON H., Mc. LEOD J.W., Mc. LEOD T.S., MAYR-HARTING A. Brit. J. Exp. Path. 1940 21 288
- 18 CARON H., RAQUET D. J. Pharm. et Chimie 1942 233
- 19 CLAPPER W.E. KURITA I.T. J. Bact. 1948 55 277
- 20 CLYMAN Ann. Int. Med. 1940 14 406
- 21 COOPER E.A. J.Soc. Chem. Ind. 1947 66 48
- 22 COOPER E.A., MASON H. J.Path. a. Bact. 1928 31 343
- 23 COOPER E.A., WOODHOUSE Bioch. J. 1923 17 39
- 24 CORDA M. Atti Accad. Fisio. Siena. 1946 Sie XI, 14 124
- 25 COWLES P.P. Yale J. Biol. Med. 1942 14 599
- 26 CUNY L. ROBERT J. J. Pharm. et Chimie 1932 15.7
- 27 DAVIS NEW ENGL. J; Med. 1944 230 734
- 28 DELACROIX P. Thèse Médecine Lyon 1947
- 29 DELAUNEY P. Thèse sc. nat. Paris 1936
- 30 DEIMAS A. Thèse Médecine Lyon 1947

- 31 DOMAGK G. Deutsch. Med. Wschr. 1935 61 250
- 32 DUMAZERT Ch. Bull. BIOL. Pharm. 1936 N° 35 593
- 33 FABRY P. C.R. Soc. Biol. 1922 88 II3
- 34 FILDES P. Lancet 1940 I 955
- 35 FORREST, WALKER Nature 1948 I6I 722
- 36 FOURNEAU E., J & Mme TREFOUEL, Nitti F., BOVET D. C.R.Soc. Biol.
1936 I22 652
- 37 FOX.C.L. Am. J. Med. Sci. 1940 I99 487
- 38 FOX C.L. Science 1940 9I 477
- 39 FOX C.L. ROSE H.M. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1942 50 I42
- 40 FREI W., JEZIERSKI A. Actes Soc. Helv. Sci. Nat. 194I I63
- 4I FRIEDEMANN T.E. J. Biol. Chem. 1938 I23. I6I
- 42 FRIEDEMANN T.E. GRAESER J.B. J. Biol. Chem. 1933 I00 29I
- 43 FRIEDEMANN T.E. KLASS R. J. Biol. Chem. 1936 II5 47
- 44 FULLER A.T. MAXTED W.R. Brit. J. Exp. Path. 1939 20 I77
- 45 GEIGER W.B. Arch. Bioch. 1946 II 23
- 46 GENEST P. BERNARD R. Rev. Canad. Biol. 1945 4 I72
- 47 GREY E. Proc. Roy. Soc. B. 1928 I03 3I2
- 48 HAAG E. DALPHIN C.H. Helv. Chim. Acta 1943 26 246
- 49 HARDEN A. J. Chem. Soc. Trans. 190I 79 6IO
- 50 HAVINGA B. JULIUS H.V. VELDSTRA H. WINKLER K.C. Modern Develop-
ment of Chemotherapy, Elsevier publishi
Comp. Inc., Amsterdam, 1946
- 5I HEIDELBERGER JACOBS J. Am. Chem. Soc. 19I9 4I 2I45
- 52 HENRY R.J. The Mode of Action of Sulfonamides 1944
- 53 HOFMANN-OSTENHOF O. Science 1947 I05 549
- 54 HURST H. Brit. Med. Bull. 1945 3 N°6 I32
- 55 IVANOVICS G. Schweiz. Ztschr. Path. Bakt. 1943 6 298
- 56 JAMES J.V. Bioch. J. 1939 33 I688
- 57 JULIUS H.V. WINKLER K.C. Antonie van Leeuwenhoek 194I 7 25
- 58 KALMANSON G.M. J. Bact. 1940 40 8I7
- 59 KAYSER F. BESSON S. EHRWEIN A. Bull. Soc. Pharm. Nancy 1949 N°4 I
- 60 KAYSER F. BESSON S. EHRWEIN A. POUCHOL J. C.R. Ac. Sc. 1948 226
970
- 6I KEMPER W., WISE B., SCHLAYER C. Am J. Med. Sci. 1940 200 484
- 62 KIESE M. Bioch. Z. 194I 307 400
- 63 KLEMM D. POE Ch. J. Bact. 1936 32 I
- 64 KOHN H.I. HARRIS J.S. J. Pharmacol. 194I 73 343
- 65 KUMLER W.D. DANIELS T.C. J. Am. Chem. Soc. 1943 65 2I90
- 66 KUMLER W.D. HALVERSTADT I.F. -id.- 194I 63 2I82

- 67 KUMIER W.D. STRAIT L.A. J. Am. Chem. Soc. 1943 65 2349
- 68 LAMBIN S. Thèse Sc. Nat. Paris 1933
- 69 LAMPEN J.O. JONES M.J. J. Biol. Chem. 1946 164 485
- 70 IEFEVRE R. Thèse Pharm. Lille 1944
- 71 LEMAY P. Progrès médical 1948 76 37
- 72 LENTI a) G. Batteriol Immunol Ital. 1946 35 I
b) Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 1946 22 332
- 73 LEVADITI C. HENRY J. Rev. Immunol. Fr. 1948 12 193
- 74 LICHSTEIN H.C. UMBREIT W.W. J. Biol. Chem. 1947 170 329
- 75 LIPMANN F. J. Biol. Chem. 1941 139 177
- 76 LOMMEL J. C.R. Soc. Biol. 1926 94 711
- 77 LONG. P.H. BLISS E.A. The Clinical and Experimental Use of Sul-
fanilamide, Sulfapyridine and Allied compounds
The Macmillan co., New-York 1939
- 78 MANN T. KEILIN D. Nature 1940 146 164
- 79 MARCHAL J.G. DUPAIX LASSEUR A., ANDRE P. Trav. Lab. Micriob. Fac.
Pharm. Nancy, 1949 Fasc. XVI 41
- 80 MARINI, BETTOLO Ric. Sci e Ricostra 1946 16 303(d'après prod. Pha
1947 2 25)
- 81 MARKUS R. Helv. Chim. Acta 1948 31 381
- 82 MARMORI Bol. Inst. Sicroter. Milan 1944 23 87; 1945 24 114
- 83 MARSCHALL E.K. J. Pediat. 1940 16 396
- 84 MAYER R.L. Biol. Med. 1937 27 Suppl. 74
- 85 Mc LEOD J.W., MAYR - HARTING A., WALKER N. J. Path. Bact. 1944
66 377
- 86 MELLON R.R. LOCKE A.P. , SHINN L.E. Am. J. Med. Sci. 1940 109 749
- 87 MENDEL B. GOLDSCHIEDER I. Bioch. Z. 1925 164 163
- 88 MIETZSCH F. Ztsch. Physiol. Chem. 1942 274 19
- 89 MONOD J. Thèse Sc. nat. Paris 1941
- 90 MONOD J. Ann. Inst. Past. 1942 68 548
- 91 NETER E. J. Infect. Diseases. 1941 68 278
- 92 NEUMANN J. Schw. Ztsch. Path. Bakt. 1947 9 419 & 426
- 93 NORTHEY E.H. The Sulfonamides and Allied Compounds, Reinhold
Ed. NEW-YORK 1948
- 94 ORDAL E.J. HALVORSON H.O. J. Bact. 1939 38 199
- 95 ORDAL E.J. SACKS J. Bact. 1943 45 43
- 96 PERSHIM G.N. J. Microb. 1947 N° 2 83
- 97 POUCHOL J. Thèse Pharm. Nancy 1950
- 98 REICHEL H.P. Dtsch. Med. Wschr. 1947 72 551
- 99 ROSE H.M. FOX C.L. Science 1942 95 412

- I00 ROSENTHAL S.M. BAUER H. U.S. Publ. Health Repts. 1939 54 I880
- I01 SARTORY A. MEYER J. Bull. Acad. Med. 1946 I30 435
- I02 SARTORY A. MEYER J. BURI K. Bull. Soc. Ch. Biol. 1947 29 I68
- I03 SERVANTIE C.R. Soc. Biol. 1925 92 700
- I04 SEVAG M.G. J. Bact. 1942 43 4II
- I05 SEVAG M.G. SHELBURNE M., MUDD S., J. Gen. Physiol. 1942 25 805
J.BACT. 1945 49 65
- I06 SCHIVE W ROBERTS E.C. J. Biol. Chem. 1946 I62 463
- I07 SCHMELKES F.C., WYSS O., MARKES H.C., LUDWIG B.J., STRANDSKOV
F.B., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1942 50 I45.
- I08 SCHOPFER W.H. Experientia 1946 2 I88
- I09 SHERMANN, ALBUS J. Bact. 1928 8 I27
- II0 SICKE F. Ztsch. f. Hyg. 192I 94 2I4
- III SIMON L.J. C.R. Ac. Sc. I897 I25 534
- II2 SPINCK W.W., WRIGHT L.D., VIVINO J.J., SKEGGS H.R., J. Exp.
Med. 1944 79 33I
- II3 STOKES J.L. J. Bact. 1949 57 I47
- II4 SUTER C.M. Chem. Rev. 194I 28 269
- II5 TATUM E.L. GIESE A.C. Arch. Bioch. 1946 9 I5
- II6 TAUGWALDER R. Thèse Sc. N°IO95 Genève 1947
- II7 TREFOUEL J., Mme TREFOUEL, NITTI F., BOVET D. C.R. Soc. Biol.
1935 I20 576
- II8 TSCHESCHE R. Z. Naturforsch. 1947. 2 b. IO
- II9 TSUCHIYA H.M. TENNENBERG C.J., CLARK W.G., STAKOSCH E.A.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1942 50 262 et 5I 245
- I20 TULASNE R. WURTZ B. C.R. Soc. Phys. Biol. Fr. 1944 N° 72
- I2I TULASNE R. WURTS B. - id- N° 73
- I22 TULASNE R. WURTZ B. - id - N° 75
- I23 WHITE H.J. PARKER J.M. J. Bact. 1938 36 48I
- I24 WILLIAMS R.T. Bioch. J. 1947 4I I
- I25 WINKLER K.C. de HAAN P.G. Arch. Biochem 1948 I8 97
- I26 WINSLER R.J. Ann. Rev. Biochem. 1949 535
- I27 WOLFF L. JULIUS H. Ann Inst. Past. 1939 62 6I6
- I28 WOOD W.B. AUSTRIAN R. J. Exp. Med. 1942 75 383
- I29 WOODS D.D. Brit. J. Exp. Path. 1940 2I 74
- I30 WOODS D.D. Ann. Rev. Biochem 1947 I6 605
- I3I WURTZ B. Communication personnelle.
- I32 YOVANOVITCH A. Bull. Soc. Ch. Biol. 1925 7 665

Table des Matières.

I° PARTIE :

Chapitre I	Rappel des principales données et théories concernant le mode d'action des <u>Sulfamides</u>	Page I
Chapitre II	Rappel des principales données et théories concernant l'action des <u>phénols</u> et de l' <u>association des sulfamides avec certains phénols</u>	Page I2

2° PARTIE :

Chapitre I	<u>Le développement d'E. COLI. Etude du métabolisme de cette bactérie dans diverses conditions</u>	
	I - Données bibliographiques	Page I6
	2 - Technique utilisée pour suivre le développement et le métabolisme bactériens dans nos essais personnels.	Page I9
Chapitre II	Résultats expérimentaux	
	I - <u>Utilisation de la source azotée par E. COLI dans nos différentes conditions expérimentales</u>	Page 24
	a) milieu contenant de l'urée	Page 24
	b) milieu contenant du sulfate d'ammonium	Page 26
	2 - <u>Utilisation de la source carbonée</u>	
	A) Disparition du glucose	Page 27
	a) milieu glucose urée	Page 28
	b) milieu glucose sulfate d'ammonium	Page 32
	B) Indice chromique	Page 35
	C) Recherche et dosage de certains produits de dégradation	Page 55
	I) Alcool	Page 55
	2) pH	Page 59
	3) Acidité totale	Page 60
	4) Acidité volatile	Page 64
	5) Acide lactique	Page 66
	6) Acide pyruvique	Page 67
	7) Gaz dégagés	Page 71

<u>CONCLUSIONS :</u>	Page 74
----------------------	---------

Index bibliographique :	Page 75
-------------------------	---------

Vu :

NANCY, le II Juillet 1950.

Le Président de Thèse,

F. KAYSER

Vu et approuvé :

NANCY, le 13 Juillet 1950.

Pour le Doyen de la Faculté :

A. MEUNIER

Vu et permis d'imprimer :

NANCY, le 20 Juillet 1950.

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université,

J. CAPELLE

